

**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern der
Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. K.-W. Jauch

**Antiangiogenetische Therapie beim humanen Pankreaskarzinom
nach orthotoper Implantation in die Nacktmaus durch einen
Mikrotubuli-Inhibitor**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Michael Friedrich
aus
Regensburg**

2006

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. C. J. Bruns

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Wagner

Priv. Doz. Dr. St. Lindner

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2006

Diese Promotion widme ich meinen
Eltern, welchen ich dieses Studium
zu verdanken habe.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1.	Angiogenese	10
1.2.	Mechanismen der Angiogenese von Tumoren	10
1.3.	Gefäßwachstum – Angiogenetic Switch	12
1.4.	Prinzip der antiangiogenetischen Therapie	14
1.5.	Antiangiogenetische Therapie durch einen Zytoskelettinhibitor	15
1.6.	Zielsetzung der Studie	23
2.	Material und Methoden	24
2.1.	Pankreaskarzinomzellen	24
2.1.1.	Tumorzelllinie	24
2.1.2.	Zellkultur	24
2.1.3.	Kryokonservierung	25
2.2.	Tiere und orthotope Injektionstechnik	26
2.3.	Verwendete Materialien und Reagenzien	27
2.4.	Tiermodell	28
2.4.1.	Etabliertes Tumormodell – Single-Shot-Therapie	28
2.4.2.	Tumor Wachstumsmodell – Langzeitversuch	29

2.5.	Färbemethoden	30
2.5.1	Hämatoxylin - Erythrosin (HE) – Färbung	30
2.5.2.	Immunhistochemische Färbungen	31
2.5.2.1.	TUNEL – Färbung	32
2.4.2.2.	Färbung von KI-67	33
2.4.2.3.	Färbung von CD31 colorimetrisch	35
2.6.	Statistik	37
2.7.	In Vivo Untersuchung	38
2.7.1.	Modell der Rückenhautkammer	39
2.7.2.	Aufbringen von L3.6pl	41
2.7.3.	Therapie	42
2.7.4.	Funktionelle Gefäßdichte und Statistik	42
3.	Ergebnisse	43
3.1.	Akut Versuch	43
3.1.1.	Makroskopischer Verlauf	43
3.1.2.	HE – Färbung	44
3.2.	Tumorstadium und Metastasierung – Langzeitversuch	45
3.2.1.	Tumorgewicht und Metastasierung	45
3.2.2.	Ki67 Auszählung Langzeitexperiment	47
3.2.3.	CD31 colorimetrisch	49
3.2.4.	TUNEL Färbung	51

3.3.	In Vivo Experiment – Dorsal Skinfold Chamber	53
3.3.1.	Makroskopische Auswertung	53
3.3.2.	Funktionelle Gefäßdichte	54
4.	Diskussion	56
5.	Zusammenfassung	62
6.	Anhang	64
7.	Alphabetisches Schrifttumsverzeichnis	68
8.	Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit	81
9.	Danksagung	83
10.	Curriculum vitae	84

1. Einleitung

In den Industrienationen stellt die Krebserkrankung nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Im Jahr 2000 gab das Robert-Koch-Institut eine Schätzung bekannt, nachdem die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen bezüglich des Pankreaskarzinoms bei Männern über 5700, bei Frauen sogar über 7700 beträgt ¹. Das Pankreaskarzinom ist für etwa 5,8 % aller Krebstodesfälle verantwortlich und ist die fünfthäufigste Krebstodesursache bei Männern, bei Frauen die vierthäufigste. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei über 68, für Frauen bei 75 Jahren und damit jeweils höher als die Gesamtzahl für Krebserkrankungen im Allgemeinen ². Auch bei den unter 60-Jährigen hat sich gegenüber der letzten Schätzung von 1993 vor allem bei Frauen die Zahl der Neuerkrankungen am Pankreaskarzinom erhöht ². Als Risikofaktoren werden Rauchen und der gesteigerte Konsum von tierischen Fetten diskutiert ¹. Ein Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und dem Pankreaskarzinom konnte in einer Fall-Kontrollstudie aus Italien im Jahr 1997 nicht festgestellt werden ³. Die mit einer Fünf-Jahres Überlebensrate von 1-4 % veranschlagten Zahlen weisen auf die Aggressivität dieser Erkrankung und den Mangel von effizienten Therapiemöglichkeiten hin ^{4,5}.

In den USA wird die Situation anhand der existierenden Krebsregister noch dramatischer eingeschätzt. Während sich die Erkrankungen am Herzkreislaufsystem auf Grund der besseren Aufklärung und Präventionsuntersuchungen der Bevölkerung verringerte, nimmt auch die Inzidenz von Krebserkrankungen zu. In den USA steht das Pankreaskarzinom an vierter Stelle aller Krebstodesursachen ⁶.

Das Wissen über die Entstehung von Tumoren bezüglich der Ursachen hat sich in den vergangenen Jahrzehnten deutlich verbessert. Jedoch konnten diese Erkenntnisse nur geringfügig für neue Therapieansätze angewandt werden. Die drei wichtigsten Behandlungsstrategien sind immer noch die Chirurgie, die Chemotherapie und Strahlentherapie ⁵⁸. Dabei bietet die Chirurgie ein hohes Maß an Radikalität, allerdings gestaltet sich aufgrund der topographischen Lage des Tumors innerhalb der Drüse zur Umgebung bereits die Diagnostik schwierig. Oft sind die Organgrenzen des Pankreas durch den Tumor überschritten und die Operationsmöglichkeiten ungewiss und schwierig.

Die meisten Krebsbedingten Todesfälle sind auf die Entstehung von Metastasen zurückzuführen. Fernmetastasen sind das Endstadium einer komplexen Auseinandersetzung des Organismus mit neoplastischen Zellen in Abhängigkeit von deren Aggressivität ⁴. Die metastasierte und/oder die lokal fortgeschrittene Tumorerkrankung wird heutzutage im Allgemeinen durch Chemotherapie und/oder Strahlentherapie behandelt. Bei der Chemotherapie ist für das metastasierte Pankreaskarzinom vor allem Gemcitabine (Gemzar®) zu nennen, welches die höchste Erfolgsquote bei dieser Erkrankung aufweist ⁶. Das Chemotherapeutikum, das bis Ende der neunziger Jahre zum Einsatz kam, war 5-Fluorouracil (5-FU), jedoch mit unbefriedigenden Ansprechraten⁷⁶. In zahlreichen klinischen Studien wurden die Vorteile des Pyrimidin-Antimetaboliten Gemcitabine gegenüber 5-FU verdeutlicht^{77 – 79}.

Die Folge, eine kombinierte Radiochemotherapie einzuführen um eine erhöhte Resektabilität zu erreichen, ist ein neuer Therapieansatz. Hierbei wird mit einer Bestrahlung von 45 bis 50,4 Gy und einer Applikation von 5-Fluorouracil (5-FU) vor einer geplanten Operation versucht, das Ziel einer kurativen Tumorreduktion zu erreichen ⁶⁵. Trotz Verbesserungen dieser wichtigen Behandlungsformen

liegt die gesamte 5 Jahres-Überlebensrate nach wie vor bei Männern und Frauen unter 5 % ¹. Es ist daher sinnvoll, neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln und zu erproben, um wirkungsvoller gegen diese Tumorerkrankung vorgehen zu können.

Neben der zytotoxischen oder zytostatischen Therapie von Neoplasien wurde in den letzten Jahren eine neue Strategie zur Behandlung insbesondere von Tumorerkrankungen entwickelt: die Zerstörung des die Neoplasie versorgenden Gefäßnetzwerkes bzw. die Hemmung der Gefäßneubildung zur Versorgung einer wachsenden Gewebsneubildung ⁸. Bis zu einem Volumen von ca. 1mm³ ist Tumorwachstum ohne Gefäßneubildung und Gefäßeinsprossung möglich, da Tumorzellen über Diffusion mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Ab einer Größe von 1mm³ ist weiteres Wachstum nur möglich, wenn die Raumforderung in der Lage ist, ein eigenes Gefäßnetzwerk aufzubauen. Diese so genannte „Angiogeneese“ unterliegt einem Gleichgewicht von positiven und negativen Regulatorproteinen. „Anti-angiogenetische“ Faktoren können die Ausbildung eines neuen Gefäßnetzwerkes stoppen oder hemmen, indem sie das Überleben, das Wachstum und die Funktion der einzelnen Endothelzelle beeinflussen ⁹. Weltweit wird an antiangiogenetischen Therapieansätzen geforscht und bis heute konnten enorme Schritte auf diesem Weg erreicht werden. Dennoch besteht immer noch ein großer Bedarf an experimenteller und klinischer Forschung, bevor diese neue Art der Tumorthherapie sich in der Klinik bewähren kann ^{10, 11}.

1.1. Angiogenese: Physiologische und pathologische Bildung neuer Blutgefäße

Das Blutgefäßsystem wird luminal von einer einschichtigen Zellschicht ausgekleidet, dem Endothel. Diese Endothelzellen sind untereinander so miteinander verbunden, dass sie die Richtung des Gefäßes bestimmen und den Blutfluß aufrechterhalten. Physiologische Gefäßneubildung während der Embryogenese kann über zwei verschiedene Wege erfolgen: Zum einen durch Vaskulogenese, bei der Endothelzellen aus nicht differenzierten Zellen entstehen. Aus diesen Hämangioblasten können endotheliale Vorläuferzellen, Angioblasten entstehen, die sich zu Endothelzellen ausdifferenzieren⁶⁹. Und zum anderen durch Angiogenese, bei der es zur Neubildung von Gefäßkapillaren aus bereits existierenden Blutgefäßen kommt^{12, 13, 14}.

Im Rahmen der Tumorerkrankung findet eine pathologische Gefäßneubildung zumeist in Form von Angiogenese statt. Das Ausmaß der Angiogenese korreliert in der Regel mit Wachstum, lokale Ausbreitung und Metastasierung von Tumoren¹³.

1.2. Mechanismen der Angiogenese von Tumoren

Maligne entartete Zellen können oft jahrelang ohne jegliche Aktivität in Geweben vorliegen (tumor dormancy)¹². Frühe Studien des Tumorwachstums konnten bisher nicht zeigen, wann oder wie der Übergang in ein angiogenetisches Stadium während der frühen Tumorentwicklung stattfindet¹⁵. Der Mechanismus der zur Tumorangiogenese führt ist sehr komplex. Da Tumore oft

unverhältnismäßig rasch wachsen und die Kapazität des ursprünglichen Gewebegefäßnetzes, aus welchem Nahrungsbestandteile und Sauerstoff bezogen werden, sehr schnell nicht mehr ausreicht, wird das Tumorgewebe hypoxisch ¹⁵. Die Reaktion auf diese Hypoxie ist die Produktion einer Vielzahl von Mediatoren, die das Wachstum und die Ausbildung neuer Blutgefäße fördern ¹⁵. Diese neuen Blutgefäße wachsen in das Tumorgewebe ein und verursachen optimale Gegebenheiten für ein Tumorwachstum und eine daraus in Folge resultierende Metastasierung des Tumors ⁵¹.

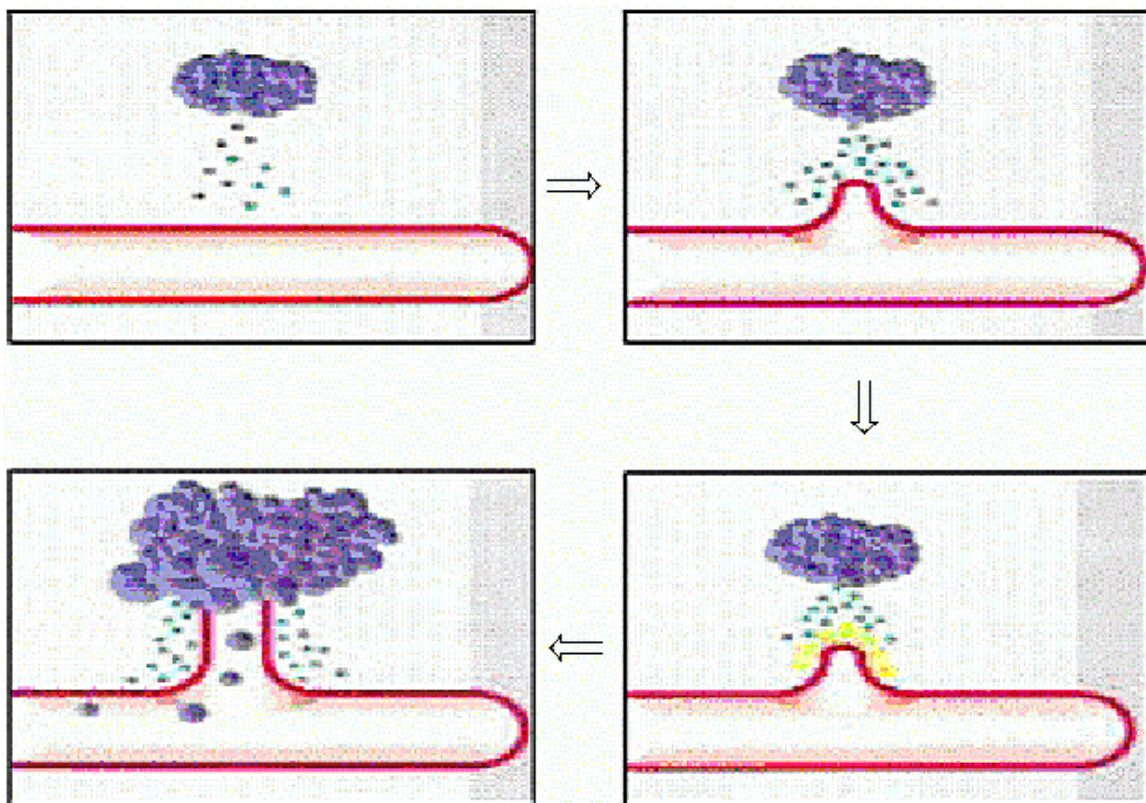


Abb. 1: Tumorzellen mit Ausschüttung von Botenstoffen und Neoangiogenese, dadurch bedingter Nährstoffversorgung und Tumorwachstum

Dieser starke Stimulus des Gefäßwachstums, die Sauerstoffarmut in Zellen, ist unter anderem beim Pankreaskarzinom vertreten ¹⁶. Eine hohe Angiogeneserate ist in diesem Gewebe dann mit einem vermehrten Tumorwachstum, einer gesteigerten Metastasenzahl und einem damit herabgesetztem Überleben verbunden ¹⁶.

1.3. Gefäßwachstum – Angiogenetic Switch

Endothelzellen, aktiviert durch einen angiogenen Stimulus, müssen sich zur Initiation der angiogenen Kaskade von ihren Nachbarzellen lösen, bevor sie in das umgebende Gewebe eindringen können. Lokal kommt es zur Auflösung der Basalmembran und der umgebende extrazellulären Matrix ¹⁷. Als nächstes beginnen die ersten Endothelzellen an dieser Stelle in Richtung des angiogenen Stimulus zu migrieren. Hinter der Front der wandernden Zellen erfolgt eine Proliferation von Endothelzellen, die zur Verlängerung des endothelialen Stranges führt. Die Stimulation der Zellen erfolgt durch eine Reihe von pro-angiogenen Faktoren ¹⁸. Die offenen Enden der gebildeten kapillären Sprosse verbinden sich dann und von diesen so genannten „loops“ entsteht durch fortlaufende Migration und Proliferation von Endothelzellen ein Netzwerk von neuen Gefäßen ¹⁹.

Bislang konnten eine Vielzahl von Faktoren festgestellt werden, welche dazu beitragen, dass es zur Neoangiogenese kommt ²⁰. Die Aktivierung von Endothelzellen stellt einen ersten Schritt dar ¹⁵. Generell können zwei Phasen unterschieden werden, die prävasculäre und vaskuläre Phase ²². In der

prävasculären Phase besitzt der Tumor keine angiogenen Eigenschaften. Tumorzellen proliferieren Angiogenese-unabhängig und der Tumor wächst bis zu einer kritischen Größe ²³. Eine weitere Größenzunahme des Tumors ist erst nach Induktion der Angiogenese möglich. Die Anregung von „schlafenden“ Tumorzellen der prävasculären Phase in einen Endothelzell-aktivierenden, proliferierenden Tumor der vaskulären Phase wurde von Folkman als „Angiogenetic Switch“ bezeichnet. Dieser wird durch eine lokale Imbalance zwischen positiven und negativen Regulatoren der Angiogenese im Tumor als Resultat der Bildung pro-angiogener Faktoren wie vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF) oder tumor necrosis factor- α (TNF- α) durch die Tumorzellen bzw. einer Herunterregulierung anti-angiogener Faktoren eingeleitet ^{22, 24}. Die vaskuläre Phase ist charakterisiert durch exponentielles Wachstum und Gewebeinvasion der Tumorzellen.

Hypothese des "Angiogenetic Switch"

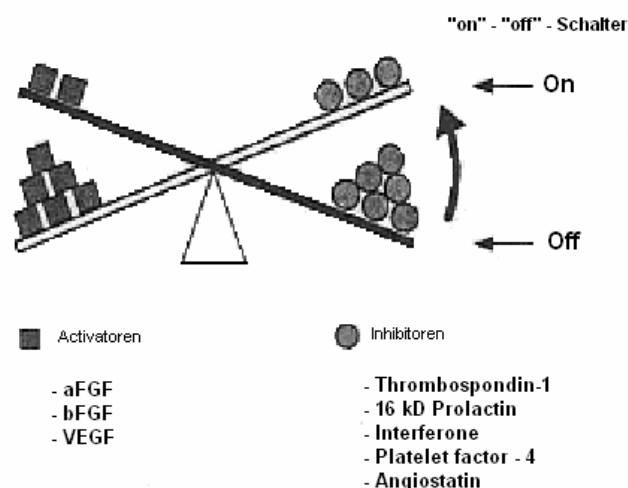


Abb. 2: Modell „Angiogenetic Switch“

Laut dem „Angiogenetic Switch“ welcher von Hanahan und Folkman 1996 in Cell vorgestellt wurde, muss man davon ausgehen, dass ein Schaltermechanismus die Angiogenese kontrolliert. Überwiegen die Inhibitoren, so ist der Schalter auf „Aus“. Kommt es jedoch z.B. durch Hypoxie in den Tumorzellen zur vermehrten Produktion von pro-angiogenen Faktoren wie bFGF, VEGF oder Interleukin-8, so springt der Schalter auf „Ein“ um ¹².

Die Hypothese des „Angiogenetic Switch“ postuliert, dass es bei der Angiogenese sowohl hemmende als auch aktivierende Faktoren gibt ^{12, 13}.

Angiogenese - Stimulatoren können in drei Gruppen eingeteilt werden ²⁵. Die erste Gruppe besteht aus den endothelialen Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren (z.B. VEGF und VEGF-Rs), welche spezifisch auf Endothelzellen wirken. Die zweite Gruppe umfasst direkt wirkende Faktoren zum Umbau und zur Morphogenese, wie Zytokine ²⁶ und angiogene Enzyme ²⁷, welche eine Reihe von Zielzellen neben Endothelzellen aktivieren. Der wichtigste Vertreter ist der Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2). Die dritte Gruppe besteht aus indirekt wirkenden Substanzen wie Adhäsions-Rezeptoren und Matrix-Proteine, wie Integrin oder Cadherin ⁶⁹. Auch Enzyme zum Abbau der Matrix, wie MMP und uPA spielen eine entscheidende Rolle bei der Gefäßneubildung. Zu den aktivierenden genetischen Faktoren gehören (Proto-) Onkogene wie Src und Ras, inhibitorische Gene sind zum Beispiel p53 und das von Hippel-Lindau-Gen. Zu den Angiogenese - Inhibitoren gehören unter anderem Angiostatin oder Endostatin. Auch Platelet Factor-4 (PF-4) und Interferon- α .

Der Anschluss an das vaskuläre System eröffnet dem Tumor zusätzlich die Möglichkeit einer hämatogenen Metastasierung ²⁸.

1.4. Prinzip der antiangiogenetischen Therapie

Die Bedeutung des Gefäßnetzes bei Tumorwachstum und Metastasierung ist heute weitestgehend identifiziert und die Möglichkeit, diesen Vorgang zu stören, eröffnet ein wichtiges therapeutisches Potential. Zwei grundsätzliche Strategien, die Blutversorgung des Tumors zu hemmen, sind zu nennen: zum einen das

Unterbinden der Entwicklung neuer Blutgefäße (Anti-Angiogenese) zum anderen das Zielen auf bereits bestehende Tumorgefäße (Vascular Targeting). Vertreter aus der Gruppe der „Vascular targeting agents“ nützen den strukturellen und physiologischen Unterschied zwischen tumorösen und normalen Blutgefäßen, um eine gezielte Zerstörung der Tumor-Gefäßstruktur zu verursachen.

1.5. Anti-angiogenetische Therapie durch einen Zytoskelettinhibitor

Tumorendothelzellen sind schnell proliferierende Endothelzellen in unreifem Differenzierungszustand. Die Struktur einer Tumorendothelzelle basiert auf einem Tubulin-Zytoskelett, das entstehende Gefäßsystem ist charakterisiert durch chaotischen Aufbau unreifer Endothelzellen, fehlenden Perizyten und hoher Permeabilität. Demgegenüber weisen Endothelzellen von physiologischen Gefäßen eine geringe Proliferationstendenz auf. Die Gefäße sind ausgereift, von Perizyten bzw. glatten Muskelzellen umgeben und von geringer Permeabilität ³. Die Struktur dieser Endothelzellen basiert auf einem Aktin-Mikrofilament-Zytoskelett.

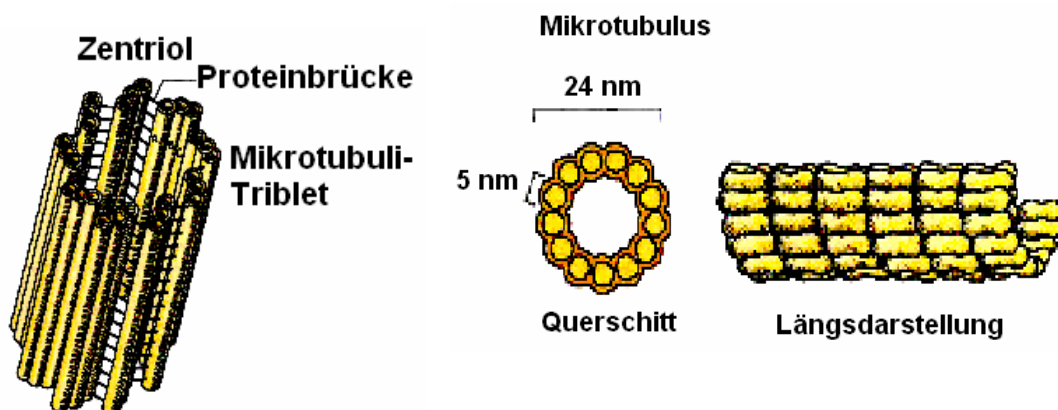


Abb. 3: Aufbau der Mikrotubuli aus Tubulin, so dass ein Hohlzylinder von etwa 24nm Durchmesser entsteht⁶⁰.

ZD6126 (AstraZeneca, Alderly Park, Macclesfield, UK) - N-Acetyl Colchicinol Phosphat, ein Abkömmling von Colchicin aus der Herbstzeitlosen - ist ein Tubulinzytoskelett-Inhibitor der die unreifen, proliferierenden Endothelzellen der Gefäße *in vivo* zerstört. Indem das Tubulinzytoskelett in der Zelle nicht mehr aufgebaut werden kann, ist es der Endothelzelle nicht mehr möglich, ihre ursprüngliche Form beizubehalten, was zu einer Verformung der Zelle führt und deren Funktionsverlust innerhalb des Gefäßes nach sich zieht. Damit ist die Blutversorgung des Tumors gestört. Es resultiert eine Minderversorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen mit daraus folgender Verstopfung der Bluttransportgefäße sowie der Kapillarsprösslinge. Dies unterbricht den Blutfluss in den Tumorgefäßen und es kommt zu ausgedehnten Nekrosen des Tumors ⁶¹. Dieser Zelltod erfolgt zuerst im zentralen Anteil des Tumors.

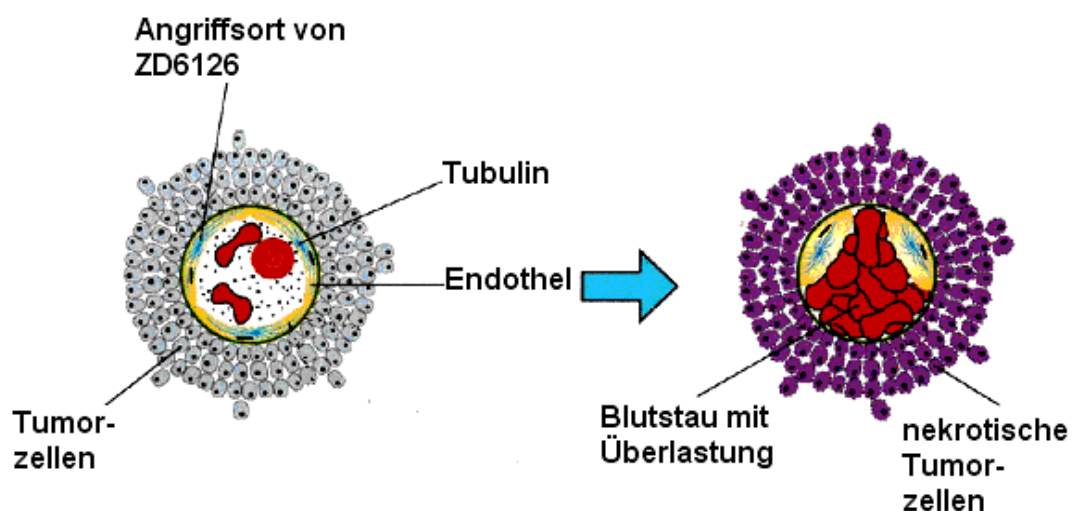


Abb. 4: Angriffspunkt von ZD6126 am Tubulinzytoskelett innerhalb der Endothelzellen. Durch die Verformung der Endothelzellen kommt es zur Minderversorgung mit Sauerstoff und wichtigen Nährstoffen, was die Verstopfung der Kapillaren und deren Überlastung zur Folge hat. Es kommt zur Nekrose des Tumors ⁶¹.

Im Gegensatz dazu existiert im gesunden Gefäßendothel keine Proliferationsrate wie sie in Tumorgefäßen anzutreffen ist. Damit bleibt das gesunde Gefäßendothel weitgehend unangetastet²⁹. Innerhalb des Primärtumors entsteht dabei eine zentrale Tumornekrose, welche auf ein Zugrundegehen der Mikrogefäße zurückgeht. Es bleibt allerdings in der Regel ein Randsaum vitalen Tumorgewebes übrig^{30, 31}. Dieser Randsaum wird von Außenstehenden Blutgefäßen versorgt.

In vivo kommt es zum Umbau der inaktiven Form ZD6126 in die aktive, wirksame Strukturform ZM445, 526. Eine Phosphatase spaltet Phosphat ab, woraus das aktive N-Acetylcolchicin hervorgeht.

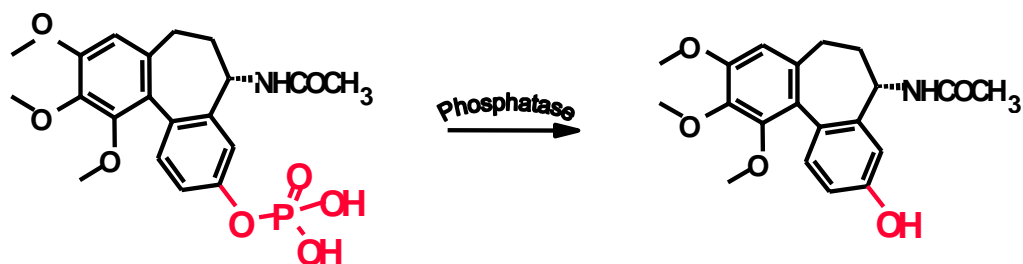


Abb. 5: ZD 6126 wird in die aktive Form ZD 6126 phenol (N-Acetylcolchicin) überführt²⁹.

Die Verbindung des „aktivierten“ ZD6126 mit dem Mikrotubulinapparat führt bei proliferierenden Endothelzellen zu einem raschen Verlust ihrer ursprünglichen Form und damit zur Proliferationshemmung. Im Gewebe führt dieser Prozess zu einem Verlust des Zellzusammenhaltes der Endothelzellen. Es kommt zur Verformung des Endothels, zur Verpfropfung von Tumorgefäßen und einer daraus resultierenden Abnahme der funktionellen Mikrogefäßdichte³². Die

Tumorzellen können nicht mehr mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden.
Es kommt zur Tumornekrose.

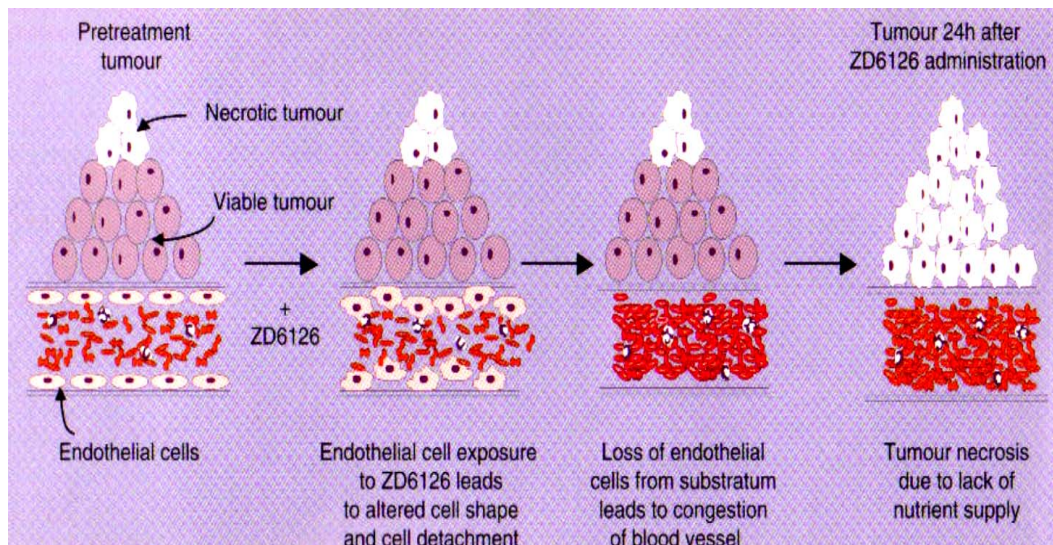


Abb. 6: Hypothese der Funktionsweise von ZD6126

ZD6126 führt zu einer Zerstörung der Mikrotubulinzytoskeletts. Dies führt zu einem Formverlust der Endothelzellen und damit zur Loslösung des Zellverbandes. Die Mikrogefäßdichte nimmt ab und die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen ist nicht mehr gewährleistet. Es kommt zur zentralen Nekrose²⁹.

Bei *in vitro* Versuchen mit konfluenten Endothelzellen (HUVEC = human umbilical vein endothelial cells), wie sie bei reifen Gefäßen vorkommen, und nicht-konfluenten HUVEC-Zellkulturen, wie bei sich regenerierendem Endothel, wurden Unterschiede in der Wirkung von ZD6126 festgestellt. Da Tumorgefäße die Kennzeichen von unreifen Endothelzellen aufweisen und Gebiete mit aktiver Angiogenese zeigen, ist es dies mit nicht-konfluierenden Endothelzellen und vergleichbar und zeigt die Auswirkungen von ZD6126 bei unterschiedlich ausgebildeter Aktin – Zytoskelett – Organisation⁵⁰. Bei konfluenten Endothelzellen ist rot ein dichtes Aktinmikrofilamentgerüst zu erkennen, wohingegen bei nicht konfluenten Zellen dieses diffus und wenig ausgeprägt

erscheint. Nach Behandlung mit $0,1 \mu\text{M}$ ZD6126 kommt es bei beiden Zellverbänden zu Veränderungen im Zellzusammenschluss, jedoch weisen nicht-konfluierende Zellen eine völlige Depolymerization von Tubulin und einen absoluten Verlust ihres Zellgefüges auf ⁵⁰. Der Zellzusammenschluss wurde unterbrochen und das Tubulinzytoskelett zerstört ⁶². Dies ist vergleichbar mit der Auswirkung von ZD6126 auf tumoröse Gefäßendothelzellen ⁵⁰.

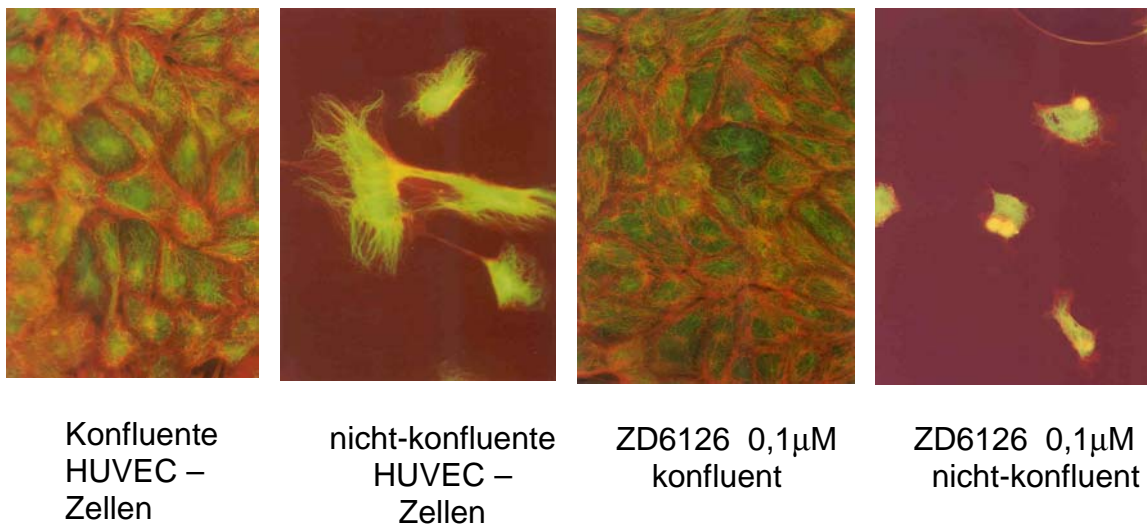


Abb. 7: Effekt von ZD6126 auf konfluierende und nicht konfluierende HUVEC – Zellen⁵⁰. Tubulin erscheint grün und Actin rot gefärbt.

Auch mit Bildgebenden Verfahren, wie der Magnetresonanztomographie wurde in einer experimentellen Studie mit weiblichen B6D2F1 Mäusen gezeigt, dass eine beträchtliche Reduzierung von Kolontumoren mittels ZD6126 zu erzielen war ⁷¹. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie konnte der Effekt von ZD6126 auf Lebermetastasen nachgewiesen werden im Mausmodell ^{33 – 35,64}.

Ob solche Gefäßumbauvorgänge bzw. - Destruktionen, wie sie der Tubulinzytoskeletthinhibitor ZD6126 hervorruft, auch durch eine nicht invasive Methode bestätigt werden können, wurde in Tierexperimenten nach intradermal Injektion von Melanomzellen evaluiert. Durch einen Hochfrequenzdoppler konnte in diesem Tierexperiment ein deutlicher Rückgang des Blutflusses innerhalb der Tumorgefäße der entstandenen Melanome beobachtet werden ⁷². Am experimentellen Nacktmausmodell zur Evaluierung der Auswirkungen von ZD6126 auf Lungenmetastasen konnten massive Nekrosen in den Tumoren und eine Wachstumshemmung der Lungenmetastasen festgestellt werden ^{32, 66}.

Bei einer Untersuchung des Nierenzellkarzinoms und des Kaposisarkoms in Nacktmäusen konnte eine signifikante Verzögerung des Tumorwachstums nach Behandlung mit ZD6126, insbesondere in Kombination mit ZD6474, einem Hemmstoff der VEGF-R2-assoziierten Tyrosinkinase, gezeigt werden ⁶³.

Bedingt durch den Wirkmechanismus, dass nicht Tumorzellen, sondern die proliferierenden Endothelzellen angegriffen werden, ist die Substanz ZD6126 nicht auf einen bestimmten Tumorzelltyp festgelegt.

Die Kombination von ZD6126 mit konventionellen Therapiemöglichkeiten verspricht eine höhere Erfolgsquote, da die wenigen übrig gebliebenen noch proliferierenden Zellen mittels Strahlen- und/oder Chemotherapie zerstört werden können. In ersten Studien wurde bereits die Wirkung von ZD6126 in Kombination mit Strahlentherapie auf das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom am Mausmodell untersucht. In dieser Studie zeigte sich bereits bei deutlich niedrigerer Dosierung von ZD6126 in Verbindung mit Strahlentherapie anhand des Proliferationsmarkers Ki67 eine deutliche Reduktion des Tumorwachstums ⁶⁵. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Wirkung des Medikaments bereits bei acht- bis sechzehnfach niedrigerer Dosierung als die maximal

tolerierte Dosis erreicht wird, was einen weiten therapeutischen Spielraum zumindest in diesem Tiermodell widerspiegelt³¹. Der Mechanismus von ZD6126 unterscheidet sich von einem Tubulinzytoskelett bindenden Medikament wie Colchicin und Vincaalkaloide darin, dass diese direkt auf Grund eines zytotoxischen Effektes wirken, hervorgerufen durch eine Unterbindung der Mitose^{36, 37}. Dabei existieren zwei grundlegend verschiedene Klassen von Verbindungen, die in der Lage sind die Dynamik von Mikrotubuli zu unterdrücken, nämlich solche, die in genügend hoher Konzentration die Polymerisation des Tubulins hemmen und solche die in der Lage sind die Mikrotubuli zu stabilisieren²³. Um einzelne Pharmaka miteinander zu vergleichen, kann der IC₅₀-Wert herangezogen werden. Dieser Wert gibt die Konzentration eines Stoffes an, die notwendig ist um das Wachstum von Zellen zu 50% zu inhibieren, das heißt je kleiner dieser Wert ist, um so zytotoxischer ist die Substanz⁷⁴. Dabei besitzt zum Beispiel Taxol (Paclitaxel), welches durch Stabilisierung zellulärer Mikrotubuli die Zellproliferation hemmt, einen zytotoxischen Effekt nach 2h mit einem IC₅₀ = 0,45µM. Colchicin, welches hemmend auf die Bildung der Mikrotubuli wirkt, hat einen IC₅₀-Wert von 1,75µM. ZD6126 dagegen, welches die selbe Wirkungsweise wie Colchicin besitzt, hat dagegen einen IC₅₀-Wert von 30µM. Dies bedeutet, dass Taxol und Colchicin im Gegensatz zu ZD6126 eine viel höhere zytotoxische Wirkung haben und damit ZD6126 eine viel höhere therapeutische Breite.

Bei Betrachtung des EC-Detachment, womit der bereits prozentuale Anteil der abgelösten Endothelzellen bei minimal zytotoxischer Dosis gemeint ist, so ist für ZD6126 ein Wert von 33,5% zu nennen. Für Taxol dagegen lediglich ein Wert von 3,3%. Zwar besitzt Colchicin einen EC-Wert von 22,5%, jedoch liegt bei

einem $IC_{50} = 1,75\mu M$ ein Pharmakon vor, welches äußerst toxisch ist und eine geringe therapeutische Breite hat.

	ZD6126	Colchicin	Taxol
Zytotoxischer Effekt (2h) ($IC_{50}=\mu M$)	30	1,75	0,45
EC-Detachment (40min) (minimal cytotoxischer Dosis) (% abgelöste Zellen)	33,5%	22,5%	3,3%

Tab. 1: Gegenüberstellung der IC_{50} -Werte und EC-Detachment.

Bezüglich der Toxizität von ZD6126 wurde eine neue Studie zur Untersuchung der Neurotoxizität von ZD6126 an Wistar Ratten nach subakuter, chronischer Dosierung von ZD6126 über einen Zeitraum von 6 Monaten überprüft. In dieser experimentellen Studie wurde nachgewiesen, dass weder durch N-Acetylcolchinol noch durch Paclitaxel periphere Neuropathie hervorgerufen wurden ⁶⁷.

1.6. Zielsetzung dieser Studie

Die aktuelle Studie untersucht die Effektivität von ZD6126 in einem orthotopen humanen Pankreastumormodell in der Nacktmaus. Ergänzend wurde die Wirkung von ZD6126 in Kombination mit dem Pyrimidin Antimetaboliten Gemcitabine evaluiert. Um die Wirkungsweise von ZD6126 *in vivo* überprüfen zu können, wurde der Versuchsaufbau der dorsalen Rückenhautkammer gewählt.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Steht der Tubulinzytoskeletthinhibitor ZD6126 bei orthotoper Injektion in Verbindung mit der zentralen Nekrosebildung?
2. Kann bei Verabreichung eines bereits in der Tumorthherapie des Pankreaskarzinoms eingesetzten Chemotherapeutikums in Verbindung mit ZD6126 ein synergistischer Effekt gewonnen werden?
3. Kann mittels Intravitalmikroskopie der durch den Tubulinzytoskeletthinhibitor verursachte Rückgang der Mikrogefäßdichte ZD6162 im Pankreastumor dargestellt werden?

2. Material und Methoden

2.1. Pankreaskarzinomzellen

2.1.1. Tumorzelllinie

Für die Durchführung der Experimente wurde die Zelllinie L3.6pl, eine hochgradig tumorigene und stark metastasierende humane Pankreaskarzinom-Zelllinie, verwendet. Diese Tumorzellen wurden aus der menschlichen COLO 357 Pankreaskarzinom-Zelllinie selektioniert. L3.6pl Pankreastumorzellen weisen ein deutlich stärkeres Primärtumorwachstum mit einer rascheren lymphogenen und hämatogenen Metastasierung im Gegensatz zu der ursprünglichen COLO 357 Zelllinien auf ^{38, 39}.

2.1.2. Zellkultur

Zur Kultivierung dieser Pankreastumor-Zelllinie wurde ein eigenes Nährmedium verwendet. Zum Herstellen dieser Suspension wurden in 415 ml Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) 5 % fetal bovine serum (FBS) hinzugefügt. Zusätzlich wurde Natriumpyruvat, nicht essentielle Aminosäuren, L-Glutamin und ein aus gleichen Teilen bestehendes Gemisch aus Penicillin und Streptomycin (Flow Laboratories, Rockville, MD, USA) benötigt. Hinzugefügt wurden 10 ml einer Vitaminlösung (Life Technologies Inc, Grand Island, NY, USA). In Zellkulturflaschen (Costar, 75 cm² Flask), die 125 ml fassen wurden 30 ml dieser Nährlösung mit den L3.6pl Zellen aufgenommen. Um ein optimales Wachstum

der Zellkulturen zu erreichen, wurden die Zellkulturflaschen in einem Brutschrank mit einem Luftgemisch von 5 % CO₂ und 95 % Luft bei 37°C inkubiert. Die Monoschicht-Kulturen waren frei von Mycoplasmen und pathogenen Mausviren (Reovirus type 3, Pneumonievirus, K Virus, Theiler's encephalitis virus, Sendai virus, minute virus, Mäuse Adenovirus, Mäuse Hepatitisvirus, Lymphozyten-Choriomeningitis-Virus, ectromelia virus, Lactat-Dehydrogenase-Virus; Assay by MA Bioproducts, Walkersville, MD, USA). Nach drei Tagen konnte der adhärenente Zellrasen auf zwei neue Zellkulturflaschen gesplittet werden. Die Zellkulturen wurden nicht länger als 12 Wochen nach dem Auftauen aus der Tiefkühlauflbewahrung bei – 70°C verwendet.

2.1.3. Kryokonservierung

Um für die Versuchsreihen ausreichend Zellen aufweisen zu können, wurden nach jeweils drei Zellteilungen eine Zellportion bei – 20°C eingefroren. Dazu wurde die Nährlösung aus der Zellkulturflasche abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml Pufferlösung (PBS, Dulbecco's, Life Technologies) neutralisiert. Nach dem Absaugen wurden die Zellen mit 1,5 ml Trypsin versetzt und fünf Minuten bei 37 Grad abgelöst. Von dem angesetzten Nährmedium wurde eine Lösung mit 30 % FCS hergestellt, 5 ml abpipettiert, mit 0,5 ml DMSO versetzt und sofort auf Eis gestellt. Die hergestellte 30 % ige FCS/Nährlösung wurde in die Zellkulturflasche gegeben, mit den Zellen vermenegt und in ein 50 ml Zentrifugiercap abgesaugt. Danach wurde dieses bei 18°C, 5 Minuten und 1200 U zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die abzentrifugierten Zellen wurden mit dem auf Eis stehenden Gemisch in Lösung gebracht. Davon wurden jeweils 1 ml in 2ml

Caps bei – 20°C eingefroren. Der Überstand wurde mittels einer Zählkammer ausgezählt.

Zum Auftauen der eingefrorenen Zellen wurde erneut eine 30%ige FCS/Nährlösung benötigt, von welcher 30 ml in ein 50 ml Zentrifugiercap gegeben wurden. Auf je eine Zellkulturflasche (50 ml) wurde 1 ml der eingefrorenen Zellen pipettiert. Die eingefrorenen Caps wurden zuerst in der Hand erwärmt und anschließend sofort in die vorbereiteten Zentrifugiercaps pipettiert. Die Zentrifuge wurde auf 18°C, 3 Minuten und 1200 Umdrehungen eingestellt. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Kulturflaschen mit 10 ml Nährmedium kultiviert.

2.2. Tiere und orthotope Injektionstechnik

Männliche Nacktmäuse (Balb/c nu/nu) wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany) erworben. Alle Tiere wurden in abgedeckten Käfigen mit einem separaten Sauerstoffanschluss unter spezieller pathogenfreier Umgebung in einem Temperatur kontrollierten Raum gehalten. Über eine Zeitschaltuhr wurde eine künstliche Beleuchtung im Zwölf-Stundenrhythmus geschaffen. Sieben Tage vor Studienbeginn wurden die Mäuse direkt in den Laborbereich zur Akklimatisation eingestallt. Die Tiere erhielten hochkalorische und proteinreiche Diät (Sustacal, Mead Johnson Nutritionals, Evansville, Indiana) während der gesamten Studie und Wasser ad libidum. Die Tiere wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien an der Universität Regensburg im Alter von 8 - 12 Wochen in die Studie mit einbezogen. Nach Ablauf von 7 Tagen nach Einstellung wurden die Versuche nach intraperitonealer Verabreichung eines

Rompun/Ketanest/Atropin-Gemisches vorgenommen. Nach Eintreten der Anästhesie wurde die Bauchhöhle lateral eröffnet und das Pankreas hervorpräpariert und in das Organ eine Zellsuspension von 1×10^6 L3.6pl Zellen in 40µl injiziert. Danach erfolgte ein sofortiger Verschluss der Operationswunde. Die Tiere wurden auf eine Wärmeplatte gelegt und mit Sauerstoff versorgt. Sobald sich die Tiere erholt hatten und aufgewacht waren, wurden sie in die Käfige zurückgelegt.

2.3. Verwendete Materialien und Substanzen

ZD6126 wurde von AstraZeneca (Macclesfield, UK) besorgt und in 0,05 % iger Natriumcarbonat Lösung aufgelöst. Gemcitabine (Gemzar, Lilly) wurde auf handelsüblichem Wege organisiert.

Antikörper wurden wie folgt erstanden:

- CD31/PECAM-1 (Pharmingen, San Diego, CA, USA)
- Peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, CA, USA)
- Stable 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Research Genetics, Huntsville, AL, USA)
- 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC; Biogenex Laboratories, San Ramon, CA, USA) Gill's haematoxylin (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)

Desweiteren wurde benötigt:

- OCT compound (Miles Inc, Elkhart, IN, USA)

- Apoptosis Detection Kit for the TUNEL procedure (Promega, Madison, WI, USA)
- prolong solution (Molecular Probes, Eugene, OR)
- streptavidin-biotin detection system (DAKO A/S, Glostrup, Denmark)
- positively-charged SuperFrost slides (Fisher Scientific Co, Houston, TX, USA)
- Gill's hematoxylin (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)

2.4. Tiermodell

2.4.1. Single-Shot-Therapie

Den Mäusen (n = 12; 24-26g) wurden Pankreaskarzinomzellen (L3.6pl 1 x 10⁶/40µl) orthotop (intrapankreatisch, subkapsulär am Übergang von Kopf zu Korpus) injiziert. Die so behandelten Mäuse wurden in vier Gruppen randomisiert. 14 Tage nach der orthotopen Tumorzellinjektion wurde die Therapie begonnen. Die Herstellung der Medikamente erfolgte kurz vor der geplanten Verabreichung. Die Tiere erhielten ZD6126 (150 mg/kg i.p; n = 3), Gemcitabine (100 mg/kg i.p; n = 3) und ZD6126 mit Gemcitabine in derselben Dosierung (n = 3; Gemcitabine 1 Stunde nach Verabreichung von ZD6126). Die Kontrollgruppe erhielt Kochsalzlösung injiziert (n = 3). Die Mäuse wurden 24 Stunden nach der durchgeführten Single – Shot - Therapie oder Kombinationstherapie euthanasiert und der Pankreastumor zur weiteren Untersuchung entnommen. Die Mäuse wurden hinsichtlich Lebermetastasen, Lymphknotenmetastasen, Peritonealkarzinose und Wundtumorentwicklung

untersucht. Die entnommenen Tumore wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Für eine histomorphologische Untersuchung wurden Paraffinschnitte von 4 - 6 µm Stärke mit einem Schlittenmikrotom angefertigt, auf Superfrost® - + Objektträger aufgezogen und eine Hämatoxylin & Eosin (H.E.) Färbung durchgeführt.

2.4.2. Langzeittherapie

Den Mäusen (n = 36; 24-26g) wurden Pankreaskarzinomzellen (L3.6pl 1 x 10⁶/40µl) orthotop (intrapankreatisch, subkapsulär am Übergang von Kopf zu Korpus) injiziert. Die injizierten Tiere wurden in vier Gruppen randomisiert. Die Herstellung der Medikamente erfolgte kurz vor der geplanten Verabreichung. Am Tag 9 erhielten die Tiere ZD6126 (75 mg/kg täglich i.p.; für 5 Tage, gefolgt von zwei behandlungsfreien Tagen, wöchentlich wiederholt; n = 8), Gemcitabine (100 mg/kg i.p.; zweimal in der Woche; n = 10), ZD6126 mit Gemcitabine in der selben Anwendung (Gemzar mit einer Verzögerung von 1 Stunde zu ZD6126; n = 8). Die Kontrollgruppe erhielt keine Behandlung (n = 10). 25 Tage nach erfolgter orthotoper Tumorzellinjektion (16 Tage nach Therapiebeginn) wurden das Experiment beendet. Die entnommenen Pankreastumore wurden gewogen und anschließend halbiert. Vergrößerten Lymphknoten (innerhalb des Bauchraums und paraaortal) sowie makroskopisch auffällige Leberherde wurden zur histopathologischen Identifizierung entnommen und nach H&E gefärbt.

Für die immunhistochemische Untersuchung für *Ki67* (Proliferationsmarker) und die H&E - Färbung wurden Präparate in Formalin eingelegt und Paraffin eingebettet. Es wurden Paraffinschnitte mit einer Stärke von 4 - 6 µm mit einem Schlittenmikrotom angefertigt und auf Superfrost® - + Objektträger aufgezogen.

Für die immunhistochemische Färbung für TUNEL (Apoptose) und CD31 colorimetrisch (Mikrogefäßdichte) wurden fresh frozen Präparate benötigt. Die zweite Hälfte der Präparate wurde sofort in Tissue-Tec eingebettet und die Präparatekästchen in flüssigen Stickstoff Schock gefroren. Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden 4 - 6 µm dicke Schnitte angefertigt auf SuperFrost® - + Objektträger aufgezogen und bei - 80°C gelagert.

2.5. Färbemethoden

2.5.1 Hämatoxylin - Erythrosin (HE) – Färbung

Die Hämatoxylin – Eosin - Färbung ist die klassische Routinefärbung des histologischen Labors. Diese Färbung dient der Veranschaulichung der Tumormorphologie. Sie zeichnet sich durch einfache Handhabung und kurze Färbezeiten aus. Die beiden Farbkomponenten Hämalan und Erythrosin unterscheiden sich dabei in ihrer Affinität zu azidophilen und basophilen Strukturen.

Je ein Schnitt eines jeden Präparats wurde mit einer H&E - Färbung behandelt. Die Schnitte wurden in einem Hämatoxylin - Bad für 5 Minuten vorbehandelt. Auf die Präparate wurde destilliertes Wasser aufgebracht. Nach 1 Minute färbten sich die Schnitte bläulich. Als nächster Schritt erfolgte die Behandlung des Zytoplasmas. Damit dieses rötlich erscheint wurden die Gewebeschnitte kurz in ein Eosin - Bad getaucht und für 1 Minute dort belassen. Anschließend wurde wiederum für 1 Minute destilliertes Wasser aufgeträufelt. Die Gewebeschnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, ein Tropfen Aquatex

(Merck) auf jedes Präparat getropft und mit einem Deckglas (Menzel - Gläser 24 x 50 mm) abgedeckt.

2.5.2. Immunhistochemische Färbungen

Die Immunhistochemie bietet durch eine hohe Zahl unterschiedlicher Antikörper, die mit dem eingesandten Gewebs- und Zellmaterial inkubiert werden können, die Möglichkeit, im Gewebe zytoplasmatische Proteinegehalte semiquantitativ zu bestimmen. Da das durch den Pathologen aufgearbeitete Gewebematerial 30 Jahre lang asserviert wird, sind entsprechende Untersuchungen noch nach Jahren mit neu entwickelten Antikörpern rückwirkend möglich. Die Vorbehandlung der Schnittpräparate ist bei Paraffinschnitten und fresh frozen slides unterschiedlich. Für die Färbung von CD31 colorimetrisch und TUNEL wurden fresh frozen slides verwendet. Die mit Tissue-Tec angefertigten fresh frozen slides wurden sofort nach der Entnahme aus dem Kühlschrank bei - 80°C zur Fixierung in - 4°C gekühltes Aceton gegeben und für 5 Minuten inkubiert. Aceton : Chloroform im Verhältnis 1:1 und ein zweites, frisches Acetonbad für je 5 Minuten folgten als zweiter und dritter Arbeitsschritt. Bei der Vorbehandlung von CD31 colorimetrisch/fluoreszierend wurde zusätzlich zu den Aceton-Bädern abschließend für 5 Minuten ein Methanol-Bad zur Reduzierung der Hintergrundfärbung vorgenommen.

Für die *Ki67*- Färbung werden Paraffinschnitte verwendet. Um das Paraffin zu entfernen wurden die Präparate bei 72°C für 20 Minuten in einem Ofen (Haereus) erwärmt. Eine absteigende Alkoholreihe mit Xylol, 100 % igem Alkohol gefolgt von einem 96 % igem Alkohol-Bad für jeweils 5 Minuten diente der Fixierung. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten zur Reinigung in PBS

gespült. Zur immunhistochemischen Färbung wurden die Objektträger mit einem Tape auf einer Plastikschiene befestigt und in die mit 200 ml Wasser bedeckte Feuchtkammer gelegt. Um ein lokalisiertes Arbeiten zu ermöglichen wurde mit einem Fettstift (DACO-Pen) ein Kreis um jedes einzelne Präparat gezogen und PBS auf den Objektträger gegeben, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern.

2.5.2.1. TUNEL – Färbung: Apoptose

Die TUNEL Färbung dient dazu, speziell apoptotische Zellen innerhalb eines Präparates zu markieren und zu quantifizieren. Apoptose ist ein kontrolliert ablaufender Prozess, deren Aktivierung und Ablauf durch ein Gleichgewicht an Zellüberlebenskaskaden und Zelltodkaskaden bestimmt ist^{2, 40}.

Auf Frischpräparaten wurde das zu färbende Gewebe mit einem Fettstift eingekreist und mit PBS bedeckt. Danach wurden die Schnitte mit einer 4 % igen Paraformaldehydlösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Es folgte eine zweimalige Waschung für je 5 Minuten mit PBS.

Die Objektträger wurden für 15 Minuten mit 2%-iger Triton X-100 Lösung bei Raumtemperatur bedeckt. Es wurde erneut zweimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Präparate mit je 80µl des Equilibration Puffers für 10 Minuten bedeckt. Wegen der Verwendung von Fluoreszenzantikörpern wurde das weitere Vorgehen in einer Dunkelkammer vorgenommen. Der benötigte Nukleotid-Mix von 51 µl für jedes Präparat setzte sich aus 45 µl Equilibration Puffer, 5 µl Nukleotid-Mix und 1 µl TdT-Enzym zusammen. Die Präparate wurden mit dem Nukleotid-Mix inkubiert. Dabei

wurden die Objektträger mit Plastik Coverslips abgedeckt. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten bei 37°C.

Die 20X-SSC-Lösung wurde auf das 10-fache mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Plastik-Coverslips wurden von den Objektträgern entfernt und ein dicker Tropfen der 20X-SSC-Lösung auf die Schnitte aufgebracht. Nach exakt 15 Minuten wurde dreimal 5 Minuten lang vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Vorbereitung für die Fluoreszenz steigernde Prolong-Lösung sollte während der 15 minütigen Inkubation erfolgen. Auf jedes Präparat wurde ein Tropfen Prolong-Lösung appliziert und mit einem Deckglas (Automat - Star 24 x 50 mm) abgedeckt. Die Objektträger wurden Licht geschützt aufbewahrt.

Mit Hilfe des TUNEL Assays können apoptotische Zellen nachgewiesen werden. Dabei kommt es zur Generierung von DNA – Fragmenten mittels endogener Endonukleasen. Das TUNEL-System verbindet DNA – Fragmente apoptotischer Zellen mit dem Fluoreszein – 12 – dUTP mit dem 3' – OH – DNA. Die mit Fluoreszein – 12 – dUTP – markierte DNA kann dann direkt in der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden⁵⁸. Pro Schnitt von 5 – 6 Tumoren je Behandlungsgruppe wurden zwischen sechs und zehn "high power fields" (hpf; 0.159 mm², 100x Vergrößerung) mikroskopisch untersucht und die durchschnittliche Anzahl der TUNEL gefärbten Zellen ausgezählt.

2.5.2.2. Färbung von Ki67 – Proliferationsindex

Nach dem zweimaligen Waschen der Paraffinschnitte mit PBS erfolgte die Vorbehandlung für 30 Minuten bei 240 Watt in Citrat-Puffer pH 7,3 in der Mikrowelle. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Präparate 15 Minuten in frisch angesetztem 3 % igen H₂O₂/Methanol (beides: Merck,

Darmstadt) bei Raumtemperatur in einer, den Boden mit Wasser bedeckenden, feuchten Kammer inkubiert, um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu hemmen.

Der primäre monoklonale Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100 auf die Schnitte aufgebracht. Die gesamte Färbung wurde mittels der Ventana Maschine (Ventana Medical Systems Inc., USA) durchgeführt. Jeder Inkubationsschritt wurde bei 37°C vorgenommen. Maschinell erfolgte ebenfalls die Streptavidin-Inkubation sowie die anschließende DAB-Färbung (Ventana Medical Systems Basic DAB detection kit, Ventana Medical Systems Inc., USA).

Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte abschließend mit Entellan (Merck, Darmstadt) und einem Deckglas (Automat - Star 24 x 60 mm) bedeckt.

Der Antikörper *Ki67* („Ki“ steht dabei für Kiel und weist auf das Institut für Pathologie der Kieler Universitätsklinik hin, „67“ steht für 1967) dient als spezifischer Marker für die Proliferation in Geweben. *Ki67* wurde ursprünglich während der Herstellung von spezifischen Markern für Hodgkin - und Reed - Sternberg Zellen isoliert ⁴¹ und reagiert mit einem Antigen, das nur in den Kernen proliferierender Zellen (G₁-, S-, G₂-Phase und Mitose) exprimiert wird, jedoch nicht in ruhenden Zellen, der G₀-Phase ^{42 - 46}. Die Färbung für *Ki67* gibt also mittelbar Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors. Alle positiven Zellen wurden ausgezählt. Zwischen sechs und zehn “high power fields” (hpf; 0.159 mm², 100x Vergrößerung) pro Schnitt von 5-6 Tumoren je Behandlungsgruppe wurden mikroskopisch untersucht und die durchschnittliche Anzahl der *Ki67*-positiv gefärbten Zellen ausgezählt. Als positiv wurden alle Zellen gewertet, die eine deutliche nukleäre Braunfärbung aufwiesen.

2.5.2.3. Färbung von CD31 colorimetrisch – Mikrogefäßdichte

Der Antikörper CD31 (Pecam – 1) färbt ein fixiertes Epitop auf Endothelzellen auf Paraffinschnitten oder fresh – frozen - slides ⁴⁷.

Mit einer 3%-igen Wasserstoffperoxydlösung (9 ml Methanol mit 1 ml 30 % Hydrogen peroxide, SIGMA) wurde die endogene Peroxidase blockiert. Die Wasserstoffperoxydlösung wurde dazu für 12 Minuten bei Raumtemperatur auf die Präparate aufgebracht. Gereinigt wurden die Schnitte durch dreimaliges Waschen für je 3 Minuten mit PBS. Anschließend erfolgte die Behandlung der Gewebeschnitte für 20 Minuten mit einer Proteinblocklösung (5 % anti – horse - serum und 1 % anti –goat - serum in PBS). Der primäre Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1:200 auf die Schnitte aufgetragen. Nach dem Abtropfen und vorsichtigem Abtupfen der Proteinblocklösung wurden 100µl des primären Antikörpers aufpipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C.

Fortgeführt werden konnte die immunhistochemische Färbung am nächsten Tag, indem nach dreimaliger Waschung der Präparate mit PBS für je 3 Minuten die überschüssige Proteinblocklösung mit dem primären Antikörper abgespült wurde. Anschließend wurde die Proteinblocklösung erneut auf die Objektträger aufgetragen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (100µl pro Präparat) mit einer Verdünnung von 1:200 in der Feuchtkammer für 60 Minuten bei Raumtemperatur.

Während der Inkubationszeit wurde der AEC-Kit vorbereitet. Die Herstellung erfolgte nach der beigefügten Beschreibung. Dabei wurden 4 ml destilliertes Wasser mit 1 ml Wasserstoffperoxyd versetzt. Die Lösung wurde auf Eis gestellt.

Die Objektträger wurden dreimal 3 Minuten mit PBS gewaschen und darauf folgend für 3 Minuten mit PBS – Tween - Lösung (20µl Tween80, SIGMA in 50 ml PBS) inkubiert. Anschließend wurde jedes Präparat mit zwei Tropfen der vorbereiteten AEC-Kit-Lösung bedeckt und 10 Minuten belassen. Die Gewebeschnitte färbten sich daraufhin rot. Die Präparate wurden mit destilliertem Wasser abgespült und für 3 Minuten mit destilliertem Wasser und Tween80 (20µl Tween80, SIGMA in 50 ml destilliertes Wasser) inkubiert. Ein Tropfen Gill's Hämatoxylin No 3 (SIGMA) für die Gegenfärbung wurde für genau 1 Minute auf die Präparate aufgebracht. Nach intensivem Spülen der Objektträger unter fließendem, destilliertem Wasser wurde PBS für 1 Minute aufgetragen. Die Präparate erhielten eine blaue Farbe.

Nach der Lufttrocknung der Schnitte wurde auf ein Deckglas ein Tropfen Aquatex Eindeckmittel (MERCK) auf ein Deckglas (Menzel - Gläser 24 x 50 mm) aufgebracht und damit das Präparat bedeckt. Zur mikroskopischen Auswertung wurden zwischen sechs und zehn "high power fields" (hpf; 0.159 mm², 100x Vergrößerung) pro Schnitt von 5-6 Tumoren je Behandlungsgruppe ausgezählt.

2.6. Statistik

Das Pankreastumorgewicht, das Körpergewicht der Mäuse und die Quantifizierung von *Ki67*, TUNEL und CD31 (PECAM 1) wurden mittels ANOVA mit einem Student-Newman-Keuls multiple comparisons Test verglichen (InStat 3.0 Statistical Software, Graphpad Software, San Diego, CA, USA). Um das geschätzte Verhältnis von Leber- und Lymphknotenmetastasen innerhalb einer Gruppe zu beurteilen wurde der Fisher's exact test verwendet. Für jede Analyse das Signifikanzniveau bei einem $p < 0.05$ festgelegt.

2.7. *In vivo* Untersuchung – Modell der Dorsalen Rückenhautkammer

Um die Behandlung des Pankreastumorwachstum mit ZD6126 *in vivo* untersuchen zu können, wird das Rückenhautkammermodell verwendet^{48 – 50}. Hierbei wurde ein Kammer-System auf den Rücken einer Maus angebracht. Dieser Titaniumrahmen besitzt in seiner Mitte eine Kammer, die auf jeder Seite mit einer Glasscheibe versehen ist. Diese transparenten Kammern ermöglichen intravitalmikroskopische Untersuchungen.

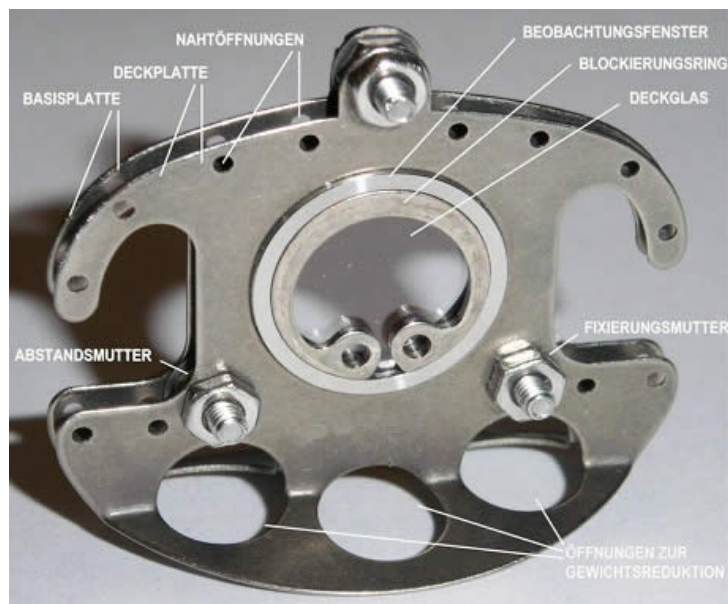


Abb. 22: Dorsale Rückenhautkammer zur intravitalmikroskopischen Untersuchung.

Nach Aufbringen des Kammer-Systems wurden am Folgetag in der Mitte der Kammer 1×10^4 L3.6pl –Tumorzellen als Pellet aufgebracht. Vom ersten Tag an erhielten die Tiere 75 mg/kg ZD6126 pro Tag i.p. ($n = 4$) für zehn Tage.

Weitere sechs Mäuse erhielten keine Therapie. Um die funktionelle Gefäßdichte (perfundierte Tumorgefäße) zu bestimmen, wurde am Tag 2, 4, 6, 7 und 8 eine

intravitalmikroskopische Untersuchung (Zeiss Axiotech Vario microscope, Göttingen, Germany) 12 Stunden nach der täglichen Gabe von ZD6126 vorgenommen.

2.7.1. Modell der Rückenhautkammer

Für das Anlegen der dorsalen Rückenhautkammer wurden die narkotisierten Tiere auf ein beheiztes OP-Feld gelegt. Mit Hautdesinfektionsmittel wurde der Rücken des Tieres desinfiziert. Auf gleicher Ebene der Maus wurde gegenseitig ein Licht zur Diaphanoskopie der Hautfalte angebracht. Die Rückenhaut wurde mobilisiert. Dabei erschienen die beiden arteriellen Hauptversorgungsäste in der Hautfalte. Lateral der vorderen und hinteren Gefäße wurde ein Faden durchgezogen. Mit Hilfe von kleinen Klemmchen wurde der Faden links und rechts über eine Halterung gespannt.

Der Rückteil der Kammer wurde von hinten an die Hautfalte gehalten. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass sich die Öffnung der Kammer in der Mitte der Gefäße befindet und sich die beiden überlagernden Gefäße jeweils lateral der basalen Schrauben befinden. Anderenfalls muss mit einer starken Minderversorgung der Rückenhaut und damit einer Gewebnekrose gerechnet werden.

Der rückwärtige Kammerteil wurde am ersten, oberen medialen Loch mit einem Faden (Prolene 4/0, FS-2S, Ethicon) angenäht. Die unteren Schrauben wurden durch die beiden Hautfalten durchpräpariert und mit zwei Klemmen gesichert. Unter Zuhilfenahme des Durchlichtes wurde auf die Haut des Tieres ein kreisrundes Feld entsprechend der mittigen Öffnung der Rückenhautkammer eingezeichnet. Dabei war darauf zu achten, dass die Maus seitlich zu liegen

kam, so dass der Rücken der Maus zum Präparator wies und der eingezeichnete Kreis oben erschien. Die Haut wurde in der Mitte des Kreises angehoben und innerhalb des Kreises herauspräpariert. Mit einer Mikropinzette und einer Mikroschere wurde das subkutane Fettgewebe sehr vorsichtig abpräpariert, ohne die Faszie zu verletzen.

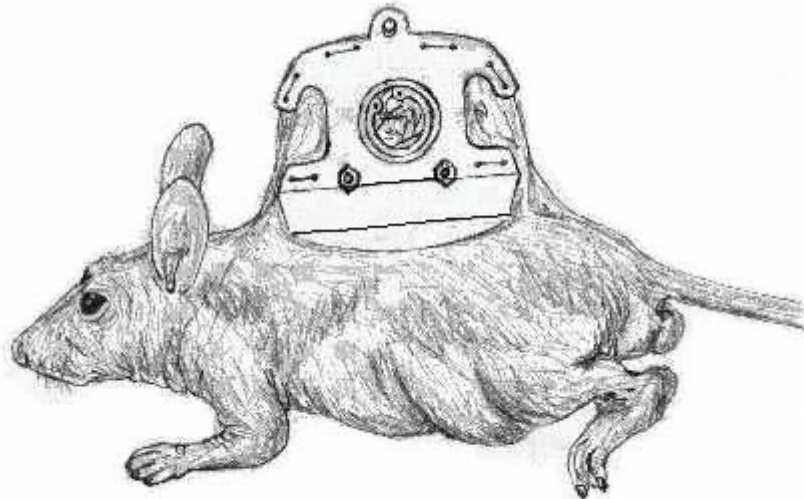


Abb. 9: Fertig angebrachte Rückenhautkammer

Die Klemmen, welche die Schrauben fixierten, wurden entfernt und die Vorderseite des Titangestelles auf die unteren Schrauben aufgesetzt. Nun wurde zwischen das freipräparierte Areal und der vorderen Rückenhautkammer physiologische Kochsalzlösung appliziert mit Vermeidung von Luftblasen. Die Schrauben wurden festgezogen und die Hautfalte an der oberen Kante angenäht. Das Tier wurde auf eine Wärmeplatte gelegt und mit Sauerstoff versorgt. Anschließend erfolgte die Unterbringung jeder Maus allein in einem Käfig.

2.7.2. Aufbringen von L3.6pl

Am Folgetag wurden den Mäusen Pankreastumorzellen implantiert. Die Tiere wurden dazu in Plexiglasröhrchen gebracht. Die Plexiglasröhrchen besaßen auf einer Seite eine schlitzförmige Öffnung in welche die Rückenhautkammer eingepasst werden konnte. Nun wurde die Plexiglaskammer auf ein extra dafür angefertigtes Untergestell gelegt, so dass das Röhrchen so fixiert werden konnten, dass die Rückenhautkammer seitlich zum liegen kam. Mit einer Sprengringzange konnte der obere Sprengring entfernt werden und das Sichtfenster der Rückenhautkammer konnte vorsichtig herausgehoben werden. Unter einem Mikroskop (Firma Zeiss, Oberkochen) wurden 1×10^4 L3.6pl Zellen als Pellet in die Mitte der Kammer aufgebracht. Anschließend wurde das Untersuchungsfeld mit einer neuen Glasscheibe verschlossen und der Sprengring eingesetzt.

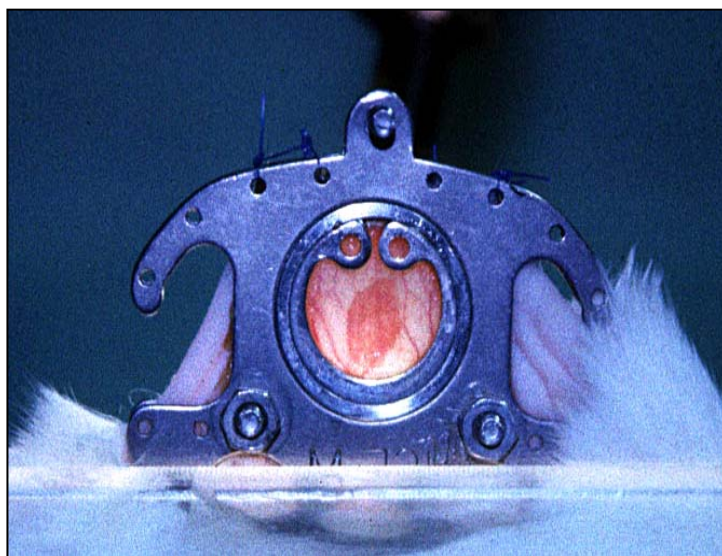


Abb. 10: Tumorzellen werden in der Rückenhautkammer aufgebracht, die Neoangiogenese wird mittels Intravitalmikroskopie beobachtet.

2.7.3. Therapie

Mit der Therapie wurde am 2. Tag nach Anbringen der Rückenhautkammern begonnen. Vier Mäuse erhielten ab diesem Zeitpunkt täglich eine Injektion ZD6126 (75 mg/kg, n = 4). Die Kontrollgruppe (n = 5) erhielt keine Therapie. Die Medikation wurde intraperitoneal verabreicht. Das Experiment wurde am 10. Tag beendet, nachdem es zu einem sehr starken Tumorwachstum innerhalb der Rückenhautkammer gekommen war und die Mäuse moribund wurden.

2.7.4. Funktionelle Gefäßdichte und Statistik

Um das Gefäßwachstum innerhalb des Tumors quantifizieren zu können, wurden mittels der Intravitalmikroskopie die Länge der perfundierten Gefäße pro Beobachtungsfläche cm/cm^2 untersucht^{80, 81}.

Die funktionelle Mikrogefäßdichte (Gefäßlänge in $\text{cm}/\text{Tumorgebiet cm}^2$) wurde mit Image J Software (Wayne Rasband, Version 1.25s, NIH, Bethesda, MD, USA) ermittelt. Dabei wurde alle 50 Pixel ein horizontales Raster über das Bild gelegt. Tumorgefäße, welche die Linien des Rasters tangierten, wurden in die Analyse eingebracht, während vertikal angeordnete Gefäße nicht mit in die Analysen aufgenommen wurden. Als Korrekturfaktor für die Berechnungen des Gefäßdurchmessers wurde $0.72 \mu\text{m}/\text{Pixel}$ verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Akut Versuch: Single-Shot-Therapie

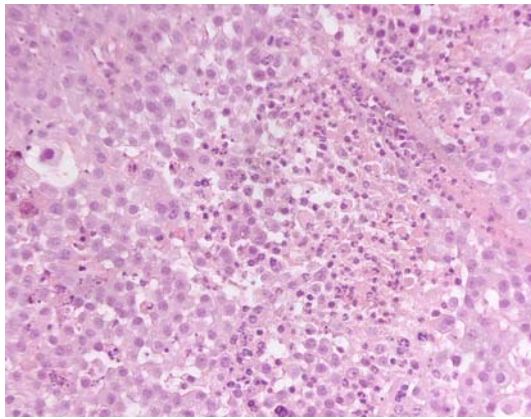
3.1.1. *In vivo* Daten des Akutversuchs

Therapie	Inzidenz			
	Pankreastumor	Leber-Met.	LN-Met.	Peritonealkarzinose
Kontrollgruppe	3/3	1/3	3/3	1/3
Gemcitabine (Gem)	3/3	1/3	3/3	2/3
ZD6126	3/3	1/3	2/3	0/3
Gem+ZD6126	3/3	0/3	3/3	1/3

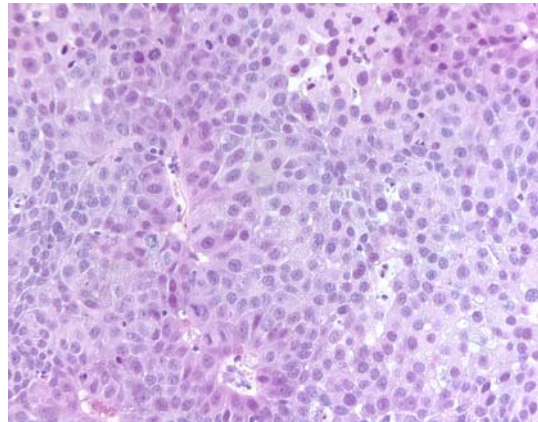
Tab. 2: Tumorzinzidenz und Metastasierung unter Therapie mit ZD6126 und Gemcitabine

Im akuten Versuch zeigt sich bei allen Versuchstieren ein deutliches Pankreaskarzinom. Bis auf die Kombinationsgruppe konnten bei jeweils einem Tier aus jeder Versuchsgruppe Lebermetastasen nachgewiesen werden. Lymphknotenmetastasen traten bei allen Mäusen auf. Bei den mit ZD6126 behandelten Tieren kamen diese vermindert vor. Eine Peritonealkarzinose als Zeichen für ein fortgeschrittenes Tumorleiden trat bei der mit ZD6126 behandelten Gruppe von Mäusen nicht auf.

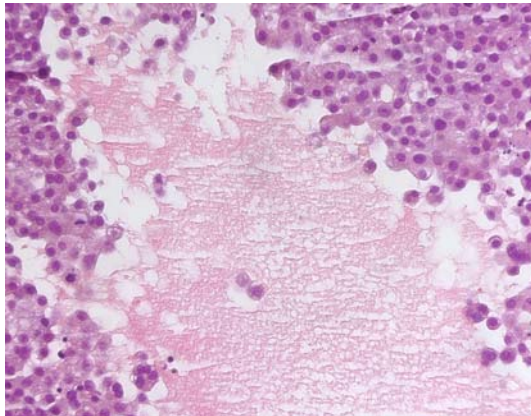
3.1.2. HE-Färbung



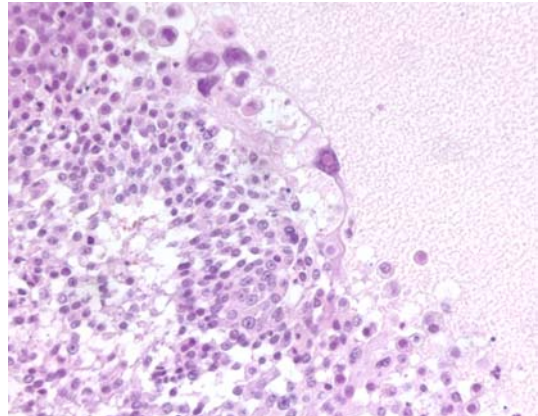
Kontrollgruppe



Gemcitabine



ZD6126



ZD6126 + Gem

Abb. 11: Tumornekrose – Entwicklung 24h nach Therapie

Innerhalb der Tumore aus der Gruppe von Mäusen mit einer durchgeführten single – shot – Therapie mit ZD6126 alleine und in Verbindung mit Gemcitabine, konnten ausgedehnte zentrale Nekroseareale festgestellt werden (Pfeile). Dieser Effekt trat bei jeweils zwei von drei der behandelten Mäuse aus den beiden Therapiegruppen auf. In der Kontrollgruppe und in der Gruppe, die mit Gemcitabine allein behandelt wurde, sind keine zentralen Nekroseareale aufgetreten.

3.2. Langzeitversuch

3.2.1. Tumorgewicht und Metastasierung

Während das durchschnittliche Tumorgewicht der Kontrollgruppe bei 1320 ± 297 mg lag, konnte ein durchschnittliches Gewicht von 687 ± 157 mg nach Gemcitabine Behandlung festgestellt werden. Bei der alleinigen Verabreichung von ZD6126 wird ein durchschnittliches Tumorgewicht von 541 ± 201 mg erreicht und bei der Kombinationstherapie ein Wert von 443 ± 61 mg.

Therapie	Inzidenz				Tumorgewicht Average \pm StDev mg	Body Weight Average \pm StDev g
	Pankreastumor	Leber-Metastasen	LN Met. ²	Peritoneal-Karzinose		
Kontrollgruppe	10/10	6/10	10/10	7/10	1320 ± 297	19.8 ± 3.7
Gemcitabine (Gem)	10/10	2/10	10/10	1/10	$687 \pm 157^*$	19.1 ± 2.2
ZD6126	8/8	1/8	$2/8^{*o}$	0/8	$541 \pm 201^{*\#}$	18.5 ± 1.9
Gem + ZD6126	8/8	1/8	$3/8^{\#s}$	0/8	$443 \pm 61^{*o\#}$	17.0 ± 2.0

¹ * Kombigruppe vs. Kontrolle, $p < 0.04$, Fisher's Exact test

² * ZD6126 vs. Kontrolle, $p < 0.01$, ^o ZD6126 vs. Gemcitabine, $p < 0.01$, [#] Kombigruppe vs. Kontrolle, $p < 0.006$, ^s Kombigruppe vs. Gemcitabine, $p < 0.06$, Fisher's Exact test

³ * Gemcitabine vs. Kontrolle, $p < 0.0004$; ZD6126 vs. Kontrolle, $p < 0.0003$; Kombigruppe vs. Kontrolle, $p < 0.000003$, unpaired Student's t-test

³ # Kombigruppe vs. Gemcitabine, $p < 0.001$, unpaired Student's t-test

³ o ZD6126 vs. Kombigruppe, $p < 0.0001$, unpaired Student's t-test

Tab. 3: Tumorgewicht und Metastasenentwicklung im Langzeitexperiment

Das durchschnittliche Tiergewicht ergab in der Kontrollgruppe $19,8 \pm 3,7$ mg, in der mit Gemcitabine behandelten Gruppe $19,1 \pm 2,2$ mg, in der mit ZD6126 therapierten Gruppe $18,5 \pm 1,9$ und in der Kombinationsgruppe signifikant weniger mit $17,0 \pm 2,0$ mg.

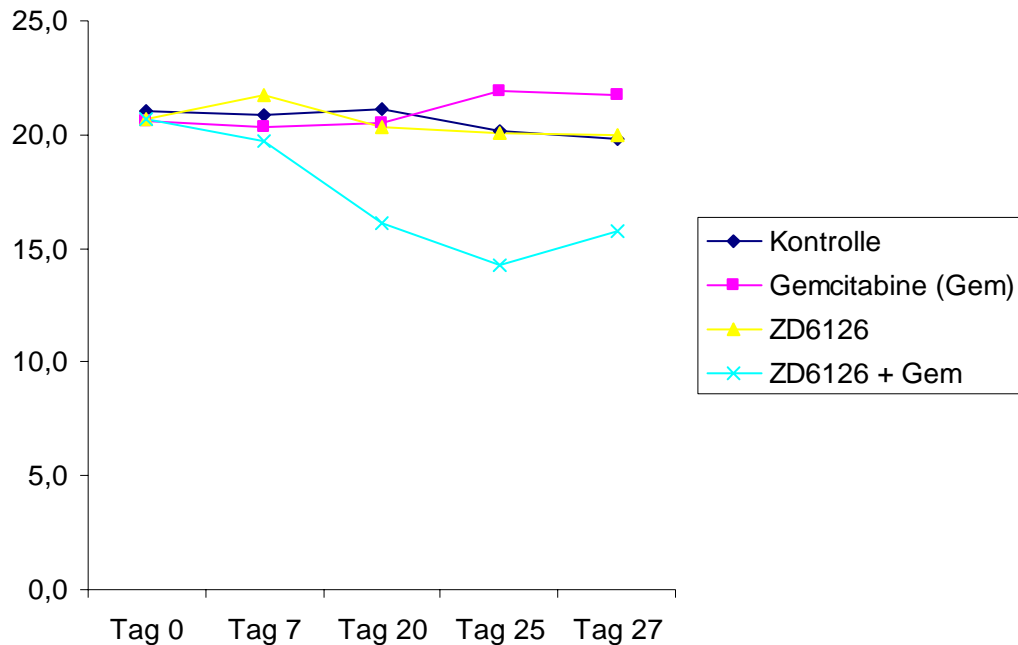
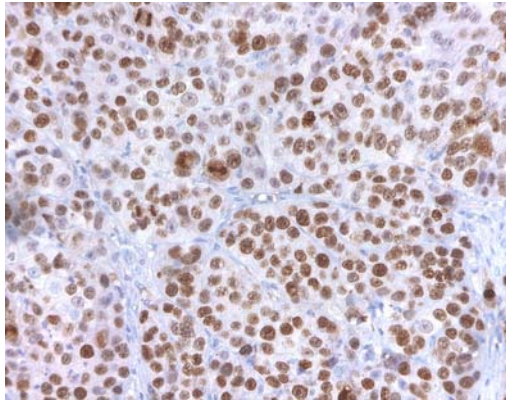


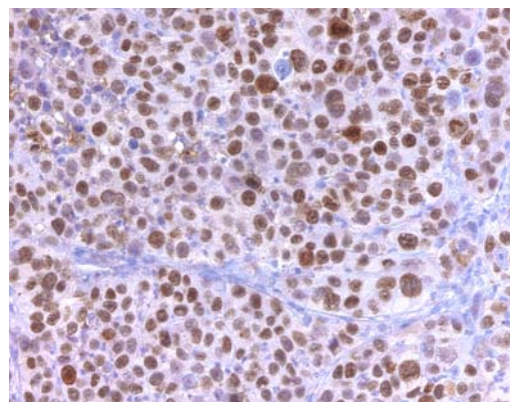
Abb. 12: Gewichtsverlauf nach Langzeittherapie

Während 10/10 Tieren in der Kontrollgruppe und nach Gemcitabine - Monotherapie Lymphknotenmetastasen aufwiesen, lagen nur bei 2/8 und 3/8 Tieren nach Behandlung mit ZD6126 bzw. Kombinationsbehandlung Lymphknotenmetastasen vor. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Kombinationstherapie erzielt. Im Gegensatz dazu stellt man bei einer alleinigen Verabreichung von Gemcitabine keine Hemmung der Lymphknotenmetastasierung fest. Ein signifikanter Unterschied in der Inzidenz der Peritonealkarzinose oder von Wundtumoren war unter den Behandlungsgruppen nicht nachweisbar.

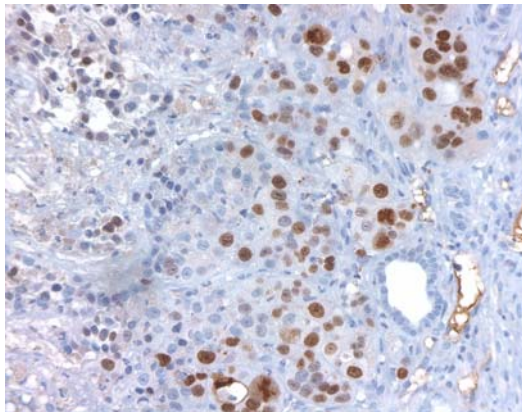
3.2.2. Ki67 Färbung



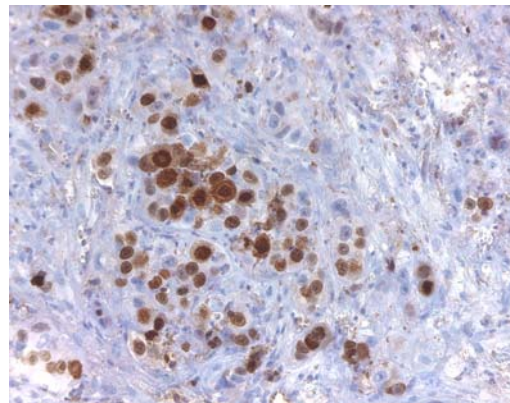
Kontrollgruppe



Gemcitabine



ZD6126



ZD6126 + Gem

Abb. 13: Immunhistochemische Analyse proliferierender Zellen im Primärtumors mittels Ki67 - Färbung, (Vergrößerung 100x)

Während in der Kontrollgruppe und in der mit Gemcitabine behandelten Gruppe sehr viele mitotische Zellen zu sehen sind, kommt es bei der mit ZD6126 therapierten Gruppe und in der Kombinationsgruppe zu einer deutlich geringeren Anzahl *Ki67*-positiver Zellen.

Die Auswertung der Primärtumore zeigte in den Gruppen, die mit ZD6126 behandelt wurden, einen deutlichen Rückgang proliferierender Tumorzellen. Tumore, welche mit ZD6126 und Gemcitabine behandelt wurden, zeigten die geringste Anzahl an *Ki67* positiven Zellen und die damit verbundene geringste

Proliferationsrate. Sowohl nach Behandlung mit ZD6126 als auch nach Behandlung mit der Kombinationstherapie lag eine signifikante Abnahme proliferierender Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe vor ($p < 0,03$) (Abb. 13,14).

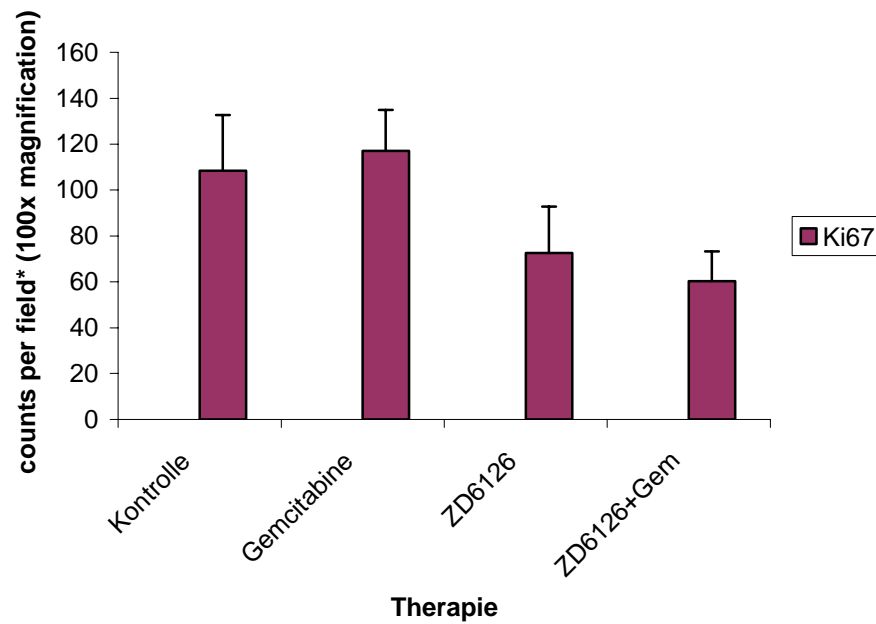
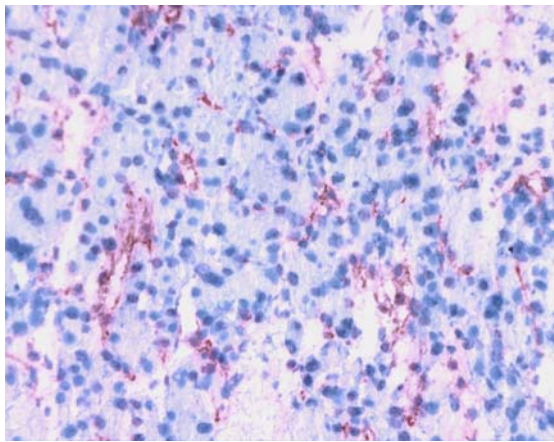
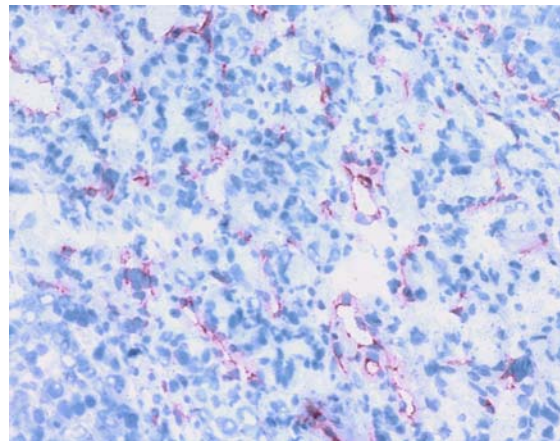


Abb. 14: Quantifizierung der proliferierenden Zellen im Primärtumor nach Ki67-Färbung

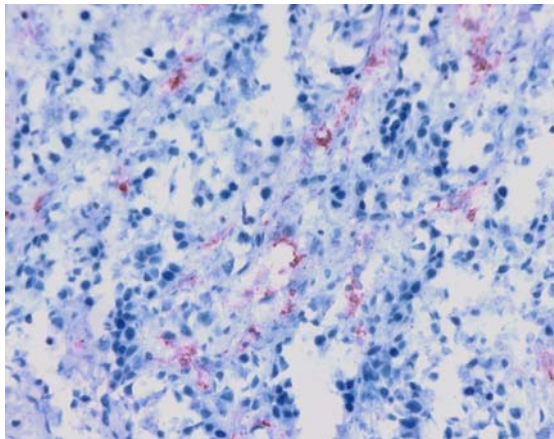
3.2.3. CD31 - Färbung



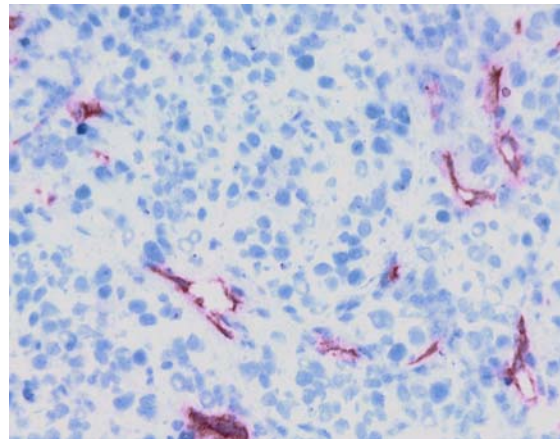
Kontrollgruppe



Gemcitabine



ZD6126



ZD6126 + Gem

Abb. 15: Immunhistochemische Analyse der Mikrogefäßdichte im Primärtumors mittels CD31-Färbung colorimetrisch, (Vergrößerung 100x)

Während sich bei den Kontrolltieren und nach Gemcitabine-Behandlung eine hohe Anzahl positiv gefärbter Gefäße im vitalen Anteil der Pankreastumore nachweisen ließ, zeigte sich nach Behandlung mit ZD6126 oder der Kombinationstherapie eine signifikante Abnahme der angefärbten Mikrogefäßdichte ($p < 0,02$).

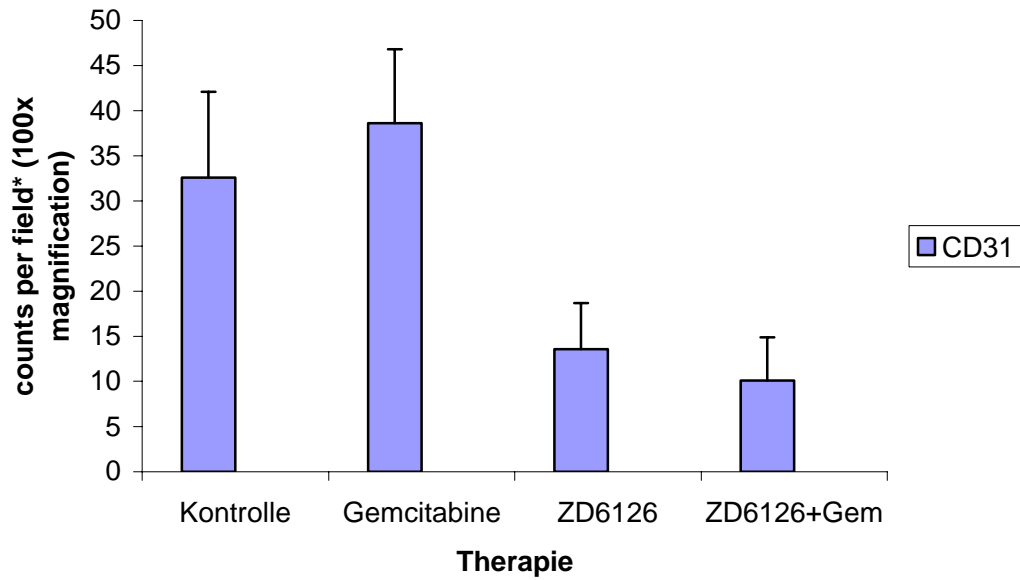
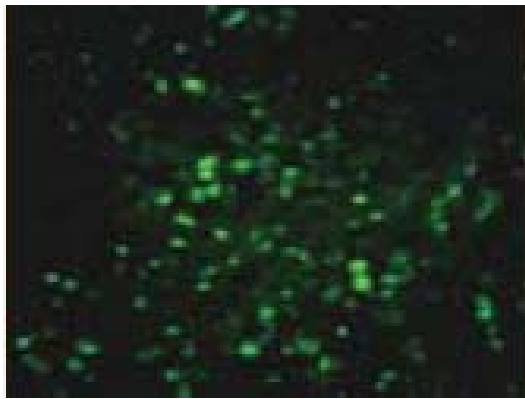


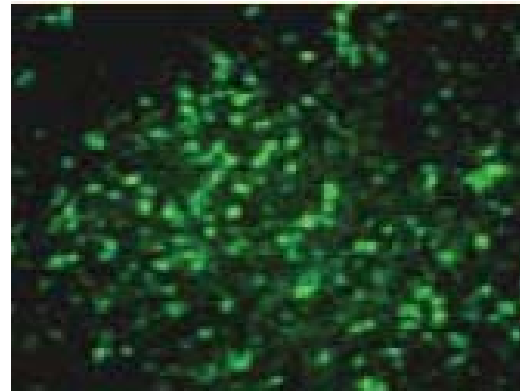
Abb. 16: Quantifizierung der Mikrogefäßdichte im Primärtumor nach colorimetrischer CD31-Färbung, ($p < 0,02$)

Während sich in der mit Gemcitabine behandelte Gruppe sogar ein geringer Anstieg in der Gefäßdichte zeigt, war in der Kombinationsgruppe das Minimum der ausgezählten positiven Zellen zu vermerken und damit die geringste Gefäßdichte (Abb. 15,16).

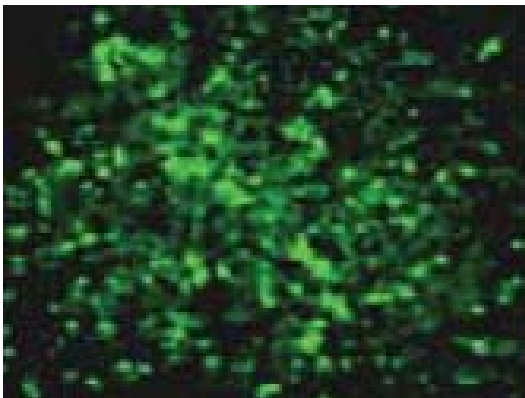
3.2.4. TUNEL Färbung



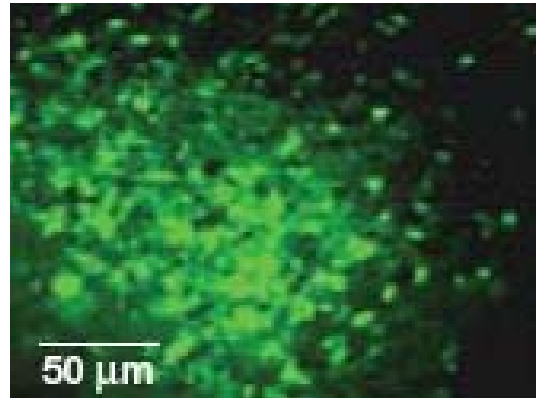
Kontrolle



Gemcitabine



ZD6126



ZD6126 + Gem

Abb. 17: TUNEL – fitc – Färbung apoptotischer Zellen im Primärtumor am 16ten Tag nach Behandlungsbeginn ($p < 0,004$)

In der TUNEL Färbung stellen sich apoptotische Zellen grün fluoreszierend dar. Es konnte im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine deutliche Zunahme an apoptotischen Zellen bei Tumoren festgestellt werden, die mit Gemcitabine oder ZD6126 jeweils alleine behandelt wurden. In der Kombinationsgruppe wurde eine signifikante Zunahme der grün fluoreszierenden apoptotischen Tumorzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt ($p > 0,004$).

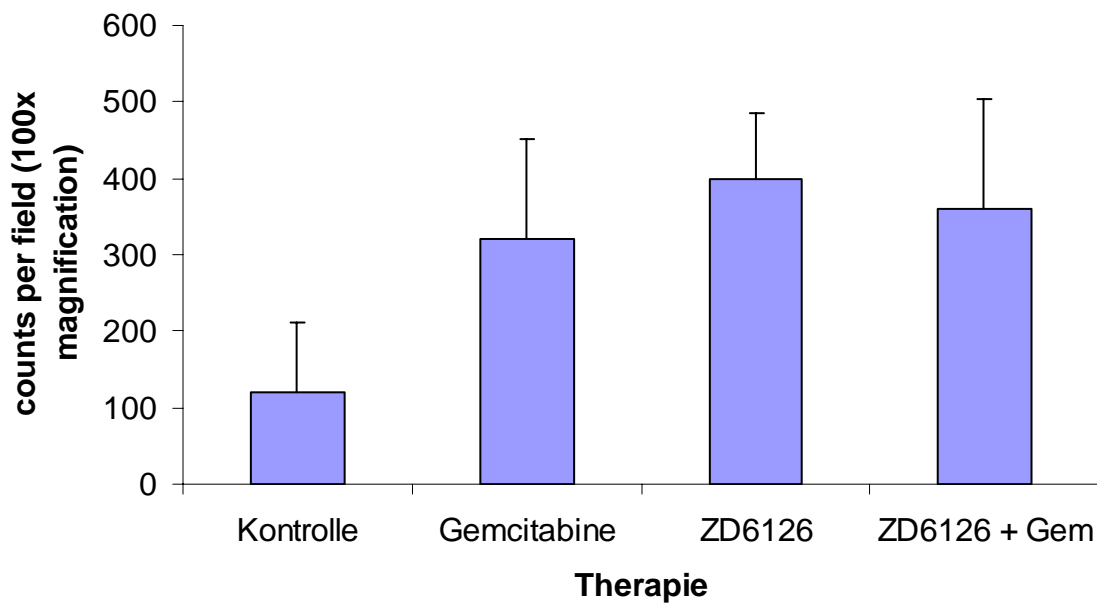
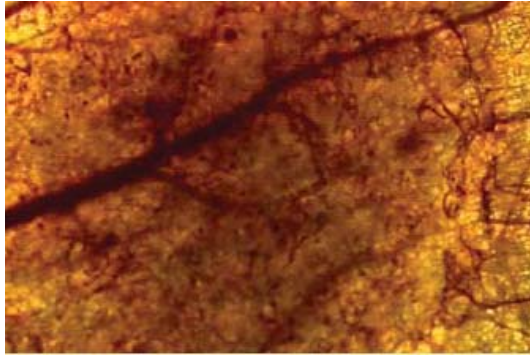


Abb. 18: Quantifizierung apoptotischer Zellen im Primärtumor nach TUNEL – fitc - Färbung, ($p < 0,004$)

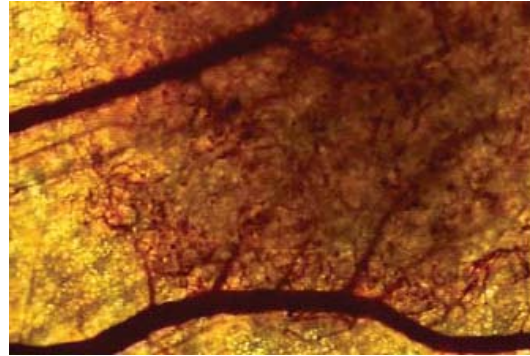
Anhand der Auszählung wurde nachgewiesen, dass in allen Behandlungsgruppen die Apoptoserate signifikant höher ausfiel als in der Kontrollgruppe. In der Gemcitabine – Gruppe wurde ein Mittelwert von 320 apoptotischen Ereignissen pro Gesichtsfeld errechnet. Bei ZD6126 alleine 400, im Gegensatz dazu bei der Kontrollgruppe lediglich 120. In Kombination wurde eine deutlich höhere mittlere Apoptoserate pro Gesichtsfeld (360) erzielt als in der Kontrollgruppe, nicht jedoch höher als nach der Behandlung mit ZD6126 alleine (Abb. 17,18).

3.3. Dorsale Rückenhautkammer

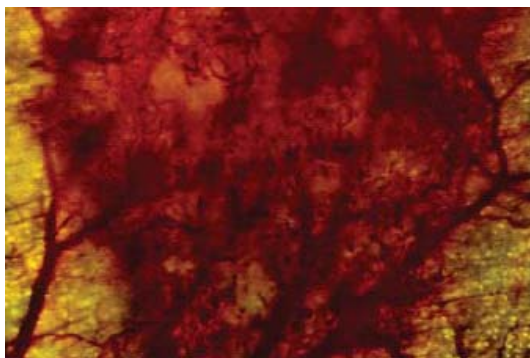
3.3.1. Makroskopische Auswertung



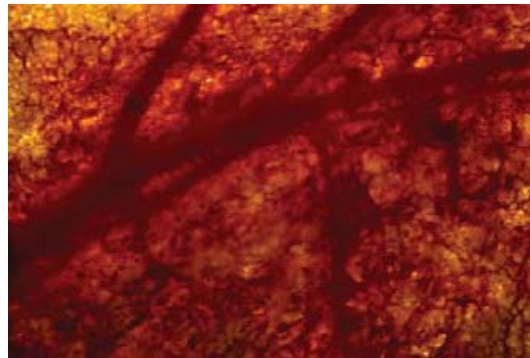
A. Kontrolle



B. Kontrolle



C. ZD6126



D. ZD6126

Abb. 19: Intravitalmikroskopische Aufnahme von Tumorgefäßen am Tag 7, (Vergrößerung 2,5x)

In Bild A und B sind intravitalmikroskopische Aufnahmen der Tumore in der Rückenhautkammer von Tieren der Kontrollgruppe am Tag 7 nach Tumorzellimplantation dargestellt. Im Kontrolltumor stellt sich bereits die typische heterogene Gefäßarchitektur mit Anastomosen und Gefäßschleifen dar. In Bild C und D werden Ausschnitte von Rückenhautkammern betrachtet, die von Mäusen nach ZD6126-Therapie stammen. Es wird ein destruiertes Gefäßsystem mit Verpfropfung der einzelnen Gefäßäste deutlich (Abb. 19).

3.3.2. Funktionelle Gefäßdichte

Die funktionelle Gefäßdichte ist definiert als Gesamtlänge der perfundierten Blutgefäße, bezogen auf das Beobachtungsareal (cm/cm^2). Damit ist sie ein wesentlicher Parameter für die Aktivität der Tumorangiogenese⁸⁰.

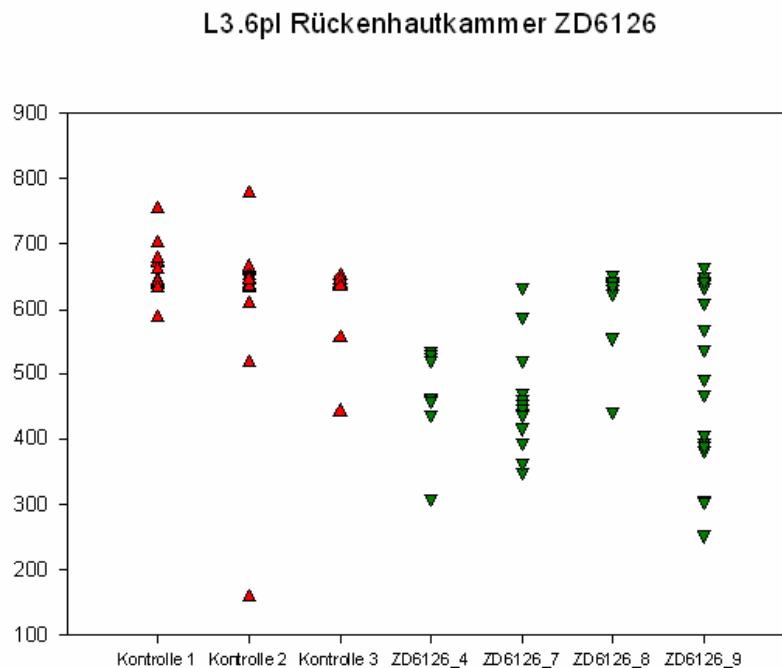


Abb. 20: Gegenüberstellung der funktionellen Gefäßdichte einzelner Bildausschnitte der mit ZD6126 behandelten und unbehandelten Tiere. Rot dargestellt ist die Kontrollgruppe ohne Therapie, grün die Mäuse welche mit ZD6126 behandelt wurden.

Der *in vivo* Versuch ergab bei den mit ZD6126 behandelten Mäusen eine geringere funktionelle Gefäßdichte als bei den Mäusen der Kontrollgruppe. In der Auswertung der Daten von 10 – 15 Bildern pro Rückenhautkammer konnte ein deutlich geringerer Gesamtgefäßlänge ($\text{cm}/\text{Tumorareal}$ in cm^2/Maus) der therapierten Tumore festgestellt werden als in der unbehandelten Gruppe (Abb. 20).

Im Vergleich der Mittelwerte beider Gruppen erkennt man eine deutlich geringere mikrovaskuläre Gefäßdichte in der therapierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe an verschiedenen Messtagen. Damit erscheint die Neovaskularisation der implantierten L3.6pl Tumore in den Nacktmäusen nach Therapie mit ZD6126 deutlich schwächer.

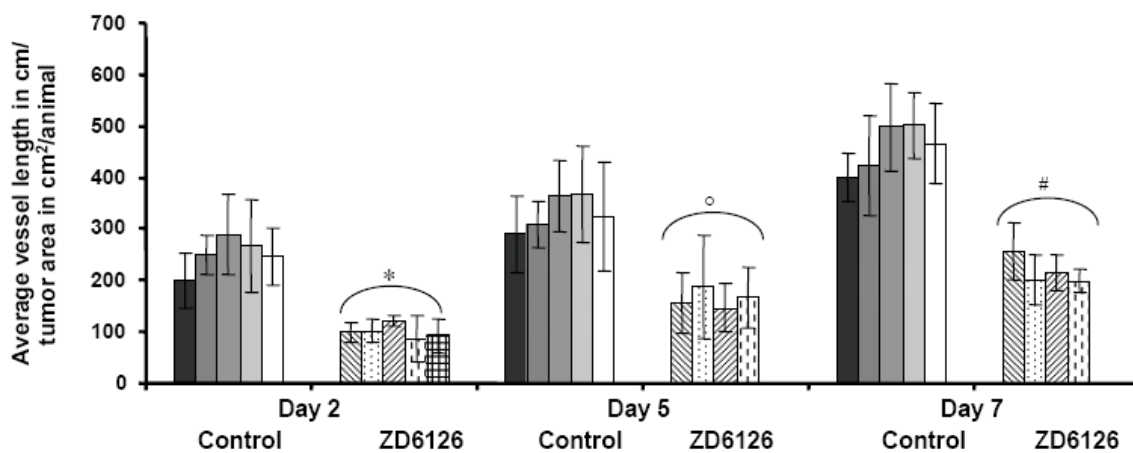


Abb. 21: Durchschnittlicher Gefäßlänge cm/Tumorgebiet in cm² pro Maus, am Tag 2, 5 und 7 (*°# p < 0,03)

Die quantitative Analyse der funktionellen Gefäßdichte bestätigt die am Tag 7 nach Tumorzellimplantation erhobenen Beobachtungen aus den makroskopischen Bildern. Im Verlauf der Tage 2, 5 und 7 war die funktionelle Gefäßdichte bei den mit ZD6126 therapierten Mäusen signifikant geringer als in der Kontrollgruppe (Abb. 21). Im Verlauf des Experiments war eine Maus aus der Therapiegruppe gestorben.

4. Diskussion

Der Zytoskeletthinhibitor ZD6126 ist ein neuartiger Vertreter aus der Gruppe der „vascular targeting“ Substanzen. ZD6126 ist in seiner Wirkungsweise vergleichbar mit einem Vertreter der Uricostatika, N-Acetylcolchicin, welches hemmend auf die Bildung von Mikrotubuli wirkt ²⁹.

Seit den 80er Jahren erfolgt die Tumorbehandlung mehr oder weniger erfolgreich in Form von verschiedenen Chemotherapeutika, die sich primär als zytostatische oder zytotoxische Substanzen gegen die Tumorzelle richten, unterschiedliche Nebenwirkungen verursachen und zum Teil Chemotherapieresistenz in den Tumorzellen erzeugen ⁷⁵. Als klassische Substanzgruppe sind hier Antimetaboliten, wie zum Beispiel Methotrexat oder Pyrimidinanaloga, wie Gemcitabine, zu nennen ⁷⁴. Aufgrund der nur mäßigen Effektivität der cytotoxisch oder cytostatisch wirksamen Substanzen, dem starken Nebenwirkungsprofil und der nachgewiesenen Chemotherapieresistenzentwicklung wurden in den letzten Jahren alternative Tumortargets neben der eigentlichen Tumorzelle - wie zum Beispiel - das tumorversorgenden Gefäßbett als therapeutische Zielstruktur gesucht und evaluiert ^{75, 76}. Die so genannte anti-angiogenetische und vascular targeting-Therapie richtet sich gezielt gegen das immature, proliferierende Tumorgefäßendothel.

ZD6126 ist ein Zytoskeletthinhibitor und inhibiert den Aufbau des Tubulinzytoskeletts während der Teilung von Endothelzellen, die wiederum während der Proliferation auf den Aufbau des Zytoskeletts angewiesen sind, um ihre Form innerhalb des Zellverbandes zu halten ^{29, 50}. Kann das Tubulinzytoskelett während der Zellteilung nicht aufgebaut werden, runden sich die Endothelzellen ab und lösen sich vom Untergrund.

Nimmt man das sogenannte EC-Detachment, den Prozentsatz abgelöster Zellen, als Zielparameter der Effektivität auf Endothelzellen, so ergibt sich für ZD6126 im Gegensatz zu dem Vincaalkaloid Colchicin oder dem Chemotherapeutikum Paclitaxel (Taxol) aus derselben Substanzklasse ein signifikant höherer Wirkungsgrad: während ZD6126 eine EC-Detachment von 33,5% aufweist, erzielt Colchicin lediglich 22,5% und im Falle von Taxol sind es nur 3,3%.

Der Mikrotubulininhibitor ZD6126 besitzt also ein mehr als 10fach höheres Wirkpotential als Taxol.

Bei einem IC_{50} -Wertes von $30\mu M$ bei ZD6126 bedeutet dies im Gegensatz zu Taxol ($IC_{50} = 0,45\mu M$), dass von ZD6126 die 60fach höhere Dosis verabreicht werden muss, bis derselbe zytotoxische Effekt erreicht wird wie mit Taxol. ZD6126 hat daher eine größere therapeutische Breite im Gegensatz zu anderen Mikrotubuliinhibitoren und damit weniger Nebenwirkungen, da der gewünschte anti-angiogenetische Effekt bereits bei einer geringen Dosis des Pharmakons erreicht wird, bei welcher kein zytotoxischer Effekt auftritt. Zwar besitzt auch Colchicin eine EC-Detachment von 22,5%, aber bei einem IC_{50} -Wert von $1,75\mu M$ ist der Spielraum sehr gering bis zum Auftreten von zytotoxischen Nebenwirkungen.

In vivo führt diese Umwandlung innerhalb des Gefüges zu einem Verlust des Endothelzellzusammenhaltes bei Untergang von einzelnen Endothelzellen im Verband, eine Proliferationshemmung von Endothelzellen mit einer daraus resultierenden Verminderung der Gefäßversorgung und konsekutivem Tumorzelluntergang, speziell in den zentralen Anteilen des Tumors, welche besonders auf eine Tumorgefäßneubildung angewiesen sind⁵¹. Vergleichbar mit anderen Tumormodellen^{31, 51} erscheint ZD6126 am ehesten verantwortlich für die großflächigen Nekrosen innerhalb des orthotopen L3.6pl-Pankreastumors.

Dieser Effekt konnte mit einer Gemcitabine Therapie alleine nicht erzielt werden. Es ist daher nahe liegend, dass die zentrale Nekrose durch vascular targeting Effekt von ZD6126 nach Zerstörung der zentralen Tumorgefäße verursacht wurde.

Im Langzeitversuch mit ZD6126 konnte eine deutliche Wachstumshemmung des orthotop implantierten Pankreastumors festgestellt werden, vergleichbar mit dem Therapieeffekt von Gemcitabine-Monotherapie. Bei Kombination beider Medikamente konnte ein additiver gegebenenfalls sogar synergistischer Therapieeffekt am Primartumor festgestellt werden.

Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine ZD6126 vermittelte Reduktion der Tumoraktivität mit einem beträchtlichen Rückgang der Mikrogefäßdichte im Tumor und verminderter Tumorzellproliferation assoziiert war. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie konnten die durch ZD6126 verursachten Effekte durch Erfassung der funktionellen Mikrogefäßdichte bildgebend dargestellt werden. In der Kontrollgruppe zeigte sich am Tag 7 nach Tumorinoculation ein gut entwickeltes, hierarchisch geordnetes Gefäßsystem, demgegenüber ein eher unentwickeltes, fast destruiertes nach Behandlung mit ZD6126. In der zeitlichen Verlaufsdarstellung des Rückenhautkammermodells wird anhand der Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme der durchschnittlichen Gefäßdichte von Tag 2 bis zu Tag 7 festgestellt. Dagegen kam es bei der therapierten Gruppe lediglich zu einer geringen Steigerung der durchschnittlichen Gefäßdichte.

Um eine Einschätzung der Ausdehnung des Zelltodes innerhalb des Tumors zu bekommen und um die optischen Kontrollen der Nekroseareale zu erhärten, wurden TUNEL-Färbungen im Pankreastumorgewebe nach Langzeittherapie angefertigt. Diese zeigte großflächige Areale an apoptotischem Zelluntergang

nach Behandlung mit ZD6126 vergleichbar mit dem Ausmaß apoptotischen Zelluntergangs nach zytotoxischer Behandlung mit Gemcitabine. Jedoch wurde durch Gemcitabine weder Einfluss auf die proliferierenden Tumorzellen noch auf die Mikrogefäßdichte genommen^{52, 53}.

Im Langzeitexperiment konnte auch gezeigt werden, dass die wiederholte Verabreichung von ZD6126 oder die Kombination aus ZD6126 und Gemcitabine mit einer geringeren Inzidenz von lymphogenen und hämatogenen Metastasen einherging, während die alleinige Therapie mit Gemcitabine keinen Einfluss auf die Metastasierung hatte.

Gemcitabine hat keinen direkten Einfluss auf die Tumorgefäße, sondern wird als Pyrimidinnukleotidanalogen in die DNS der Tumorzellen eingebaut und hemmt im Zellzyklus den Übergang von der G1- in die S-Phase hemmt^{74, 82} mit dem Resultat des programmierten Zelltods (Apoptose)⁸².

In dem orthotopen L3.6pl Pankreastumormausmodell wurden bereits andere anti-angiogenetische Substanzen in Kombination mit klassischer Chemotherapie getestet. Interessanterweise zeigte sich im Vergleich zu den vorangegangenen Studien mit direkten und indirekten Angiogeneseinhibitoren (EGF-R-Antikörper oder EGF-R-Tyrosinkinase-Inhibitor) in dieser Studie unter Verwendung des Zytoskelett-Inhibitors ZD6126 eine wesentlich effektivere Reduktion der Lymphknotenmetastasierung, woraus sich vermuten lässt, daß proliferierende Lymphendothelzellen im Rahmen der Lymphangiogenese ebenfalls auf ein Tubulinzytoskelett angewiesen sind und damit ein Target für ZD6126 sind^{52,54}.

Die immunhistochemische Untersuchung des Proliferationsindex mittels *Ki67* zeigte in der Kombinationstherapie von Gemcitabine und ZD6126 eine signifikante Reduktion proliferierender Zellen. Diese Proliferationshemmung fiel nach Kombinationstherapie deutlicher stärker aus als nach Monotherapie mit

Gemcitabine oder ZD6126. Ferner zeigte sich in der CD31-Färbung erwartungsgemäß ein ausgeprägter Rückgang der Mikrogefäßdichte in der Monotherapie mit ZD6126 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich in der Intravitalmikroskopie nach Therapie mit ZD6126 bezüglich der funktionellen Gefäßdichte.

Das Langzeitexperiment und die dorsale Rückenhautkammer zeigen sowohl den anti-angiogenetischen Effekt von ZD6126 bei alleiniger Verabreichung als auch den positiven Effekt einer Kombinationstherapie mit dem Zytostatikum Gemcitabine.

Gemcitabine ist zurzeit Standardtherapie für die Behandlung vom lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Pankreaskarzinom. Es konnte bereits in anderen Modellen gezeigt werden, dass der vascular targeting Effekt von ZD6126 möglicherweise erhöht ist, wenn der Zytoskelettinhibitor in Kombination mit Cisplatin, Paclitaxel und/oder Strahlentherapie verabreicht wird^{51, 55, 56}. Ein charakteristisches Merkmal von ZD6126 und anderen antivaskulären Substanzen ist das Hervorrufen von zentralen Tumornekrosen bedingt durch den Gefäßocclusionseffekt, allerdings in der Regel verbunden mit einem peripheren Randsaum aus lebenden Tumorzellen^{31, 57}.

Der Wirkmechanismus von ZD6126 macht die Substanz deswegen für eine Kombinationstherapie mit anderen Therapiemöglichkeiten wie Zytostatika und Strahlentherapie so interessant, da diese insbesondere in dem nach wie vor vaskularisierten und proliferierenden, peripheren Randsaum des Tumors ihre Wirkungsweise haben. Es erscheint daher sinnvoll, ZD6126 in Kombination mit konventionellen und etablierten Therapiestrategien gegen das Pankreaskarzinom einzusetzen.

Die Langzeittherapie mit ZD6126 wurde im Tierexperiment über den Behandlungszeitraum gut toleriert und resultierte in einer deutlichen Verkleinerung des Primärtumors und einer verminderten Anzahl an Lymphknotenmetastasen. Dennoch wurde der größte antitumorale Effekt in dem Modell nach Verabreichung der Kombination aus ZD6126 und Gemcitabine hervorgerufen. Das Ergebnis bestätigt das therapeutische Potential einer Kombination aus vascular targeting Substanzen und konventioneller Chemotherapie, in dem unterschiedliche Wirkmechanismen auf verschiedene Zellpopulationen (Endothelzellen und Tumorzellen) im Tumor ausgeübt werden.

5. Zusammenfassung

Die Zahl der Menschen, die am Pankreaskarzinom erkranken, ist in Deutschland seit vielen Jahren fast unverändert⁸³. Das Pankreaskarzinom gehört in die Gruppe von Tumoren, welche erst in fortgeschrittenem Stadium symptomatisch werden⁸³. Für die Prognose der Erkrankung und den Therapieerfolg spielt gerade die Metastasierung eine entscheidende Rolle.

Im Single-Shot-Versuch mit Therapiebeginn 14 Tage nach Tumorimplantation, konnte nachgewiesen werden, dass ZD6126 zentrale Tumornekrosen verursacht. Im Langzeitversuch *in vivo* wurde durch immunhistochemische Färbung von CD31, *Ki67* und TUNEL der antiangiogenetische Effekt auf das Pankreaskarzinom nachgewiesen. Es zeigte sich eine Verringerung der Pankreastumormasse mit Reduktion der Lymphknotenmetastasen. Die Kombinationstherapie mit Gemcitabine führte zu einem additiven Effekt bezogen auf den antitumorigenen Effekts beim Pankreaskarzinom im orthotopen Nacktmausmodell.

Sowohl hinsichtlich des Primärtumorstwachstums als auch hinsichtlich der Inzidenz von Fernmetastasen erscheint der Zytoskelettinhibitor ZD6126 ein neuer und viel versprechender therapeutischer Ansatz, insbesondere in Kombination mit konventioneller Chemotherapie.

Die Vorteile von Vascular-Targeting-Substanzen wie ZD6126 gegenüber klassischer cytotoxischer oder cytostatischer Tumorthherapie liegen unter anderem darin, dass das Target die immaturen, proliferierenden Tumorendothelzellen sind, die im Gegensatz zu den Tumorzellen problemlos zugänglich sind und in verschiedenen Tumorarten vorkommen. Die Entwicklung von Resistenzmechanismen bleibt aus, und wegen fehlender Proliferation

physiologischer Endothelzellen bleibt die Therapie weitgehend selektiv auf das physiologische Gefäßsystem.

6. Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Tumorzellen mit Ausschüttung von Botenstoffen und Neoangiogenese, dadurch bedingter Nährstoffversorgung und Tumorwachstum

Abb. 2: Modell „Angiogenetic Switch“

Abb. 3: Mikrotubuli Aufbau

Abb. 4: Angriffspunkt von ZD6126 am Tubulinzytoskelett

Abb. 5: Umbau von ZD6126

Abb. 6: Hypothese der Funktionsweise von ZD6126

Abb. 7: HUVEC - Zellen

Abb. 8: Rückenhautkammer aus Titan

Abb. 9: Rückenhautkammer auf Maus angebracht

Abb. 10: aufgetragene Tumorzellen innerhalb des Sichtfensters

Abb. 11: Tumornekrose – Entwicklung 24h nach Therapie; Nekroseareale durch Pfeile gekennzeichnet

Abb. 12: Gewichtsverlauf nach Langzeittherapie

Abb. 13: Immunhistochemische Analyse des Primärtumors mittels Ki67-Färbung, (Vergrößerung 100x)

Abb. 14: Quantifizierung der proliferierenden Zellen nach Ki67-Färbung

Abb. 15: Immunhistochemische Analyse des Primärtumors mittels CD31 colorimetrisch, (Vergrößerung 100x)

Abb. 16: Quantifizierung der Mikrogefäßdichte im Primärtumor nach colorimetrischer CD31-Färbung, ($p < 0,02$)

Abb. 17: TUNEL – fitc – Färbung apoptotischer Zellen im Primärtumor am 16ten Tag nach Behandlungsbeginn ($p < 0,004$)

Abb. 18: Quantifizierung apoptotischer Zellen im Primärtumor nach TUNEL – fitc - Färbung, ($p < 0,004$)

Abb. 19: Intravitalmikroskopische Aufnahme von Tumorgefäßen an Tag 7, (Vergrößerung 2,5x)

Abb. 20: Gegenüberstellung der funktionellen Gefäßdichte einzelner Bildausschnitte der mit ZD6126 behandelten und unbehandelten Tiere.

Abb. 21: Durchschnittlicher Gefäßlänge cm/Tumorgebiet in cm^2 pro Maus, am Tag 2, 5 und 7 (*°# $p < 0,03$)

Abb. 22: Abbildung des zellbiologischen – immunologischen Forschungslabors des Universitätsklinikums Bergmannsheil

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: IC50

Tab. 2: Tumorverlauf und Metastasierung unter Therapie mit ZD6126 und Gemcitabine

Tab. 3: Tumorgewicht und Metastasenentwicklung im Langzeitexperiment

Materialliste

Sterilbank	Heraeus
Begasungsbrutschrank, Typ BB16	Heraeus
Zentrifuge	Heraeus
n/n Bulb c Mäuse	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany
ZD6126	AstraZeneca, Macclesfield, UK
Gemzar	Lilly
Gewebekulturflaschen	Sarstedt
Zellkulturflaschen, 75cm ²	Costar
Gefrier Röhrchen	Corning
Digitalkamera, COOLPIX 995	Nikon
Fotokamera, Wild Leitz MPS 48	Leica
Mikroskop, Typ Wild M10	Leica
Op-Mikroskop, Modell OPMI 1-FC	Zeiss
Nähmaterial, Prolene 4/0	Ethicon
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (PBS), ph=7,4	Sigma
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Flow Laboratories, Rockville, MD, USA
Vitaminlösung	Life Tech. Inc, Grand Island, NY, USA
Ketamin 10%, WDT	Garbsen
Xylazinhydrochlorid, Rompun 2%	Bayer Leverkusen
Atropinsulfat 0.5mg	B. Braun
CD31/PECAM-1	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, CA, USA
Stable 3,3'-diaminobenzidine (DAB)	Res. Genetics, Huntsville, AL, USA
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Tween80	SIGMA
AEC-Kit	Biogenex Laboratories, San Ramon, CA, USA;
Gill's hematoxylin	Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA
OCT compound	Miles Inc, Elkhart, IN, USA

TUNEL Apoptosis Detection Kit	Promega, Madison, WS, USA
Prolong solution	Molecular Probes, Eugene, OR
Streptavidin-biotin detection system	DAKO A/S, Glostrup, Denmark
positively-charged SuperFrost slides	Fisher Scientific Co, Houston, TX, USA
DACO-Pen	Daco
Futtermittel	Sustacal, Mead Johnson Nutritionals, Evansville, Indiana
Deckglas 24 x 60 mm	Automat - Star
Deckglas 24 x 50 mm	Menzel - Gläser
Entellan, Eindeckmittel	Merck, Darmstadt
Aquatex, Eindeckmittel	Merck, Darmstadt

7. Alphabetisches Schrifttumsverzeichnis

Asaishi, K., Endrich, B., Gotz, A., and Messmer, K. Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3. Cancer Res., 41: 1898–1904, 1981. **47**

Augustin HG. Antiangiogenic tumour therapy: will it work? Trends in Pharmacol Sci 19:216, 1998. **75**

Blakey, D.C., Westwood, F.R. Walker, M, Hughes G, Davis P.D., Ashton S.E. and Ryan A.J., Antitumor activity of the novel vascular taregeting agent ZD6126 in a panel of tumor models; Clin. Cancer Res., 2002; 8:1974-1983. **31**

Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. Adv Cancer Res. 1996;69:135-74. **24**

Braun N., Papadopoulos T., and Müller-Hermelink H.K. Cell cycle dependent distribution of the proliferation associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. Virchows Arch. B 56, 25 – 33, 1988. **43**

Broschüre Astra Zeneca. **29**

Brower V. Tumor angiogenesis – new drugs on the block. Nature Biotechnology 17:963, 1999. **76**

Brown NS, Bicknell R. Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis. Biochem J. 1998 Aug 15;334 (Pt 1):1-8. **27**

Bruno S. and Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. Cell Prolif. 25, 31 – 40, 1992. **45**

Bruns C. J., The expression of angiogenesis-regulating genes by human pancreatic carcinoma cells correlates with metastatic potential, 1998. **38**

Bruns, C. J., Shrader, M., Harbison, M. T., Portera, C., Solorzano, C. C., Jauch, K. W., Hicklin, D. J., Radinsky, R., and Ellis, L. M. Effect of the vascular endothelial growth factor receptor-2 antibody DC101 plus gemcitabine on growth, metastasis and angiogenesis of human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice. Int. J. Cancer, 102: 101–108, 2002. **51**

Bruns, C. J., Solorzano, C. C., Harbison, M. T., Ozawa, S., Tsan, R., Fan, D., Abbruzzese, J., Traxler, P., Buchdunger, E., Radinsky, R., and Fidler, I. J. Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma. Cancer Res., 60: 2926–2935, 2000. **52**

Burns, Goertz, X.Qi, Zhang, et al. Microbubble destruction-reperfusion and high frequency Doppler : two ultrasound methods used for the noninvasive measurment of the vascular-targeting effects of ZD6126. AACR-NCI-EORTC. **72**

Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. J Clin Oncol 15(6): 2403 – 2413. Jun 1997. **78**

Casper ES, Green MR, Kelsen DP, Heelan RT, Brown TD, Flombaum CD, Trochanowski B, Tarassoff PG. Phase II trial of gemcitabine (2,2'-difluorodeoxycytidine) in patients with adenocarcinoma of the pancreas. Invest New Drugs 12(1):29 – 34. 1994. **79**

Cohen J; Behind the headlines of endostatin's ups and downs; Science 1999 Feb 26; 283(5406):1250-1. **10**

Davis, P. D., Dougherty, G. J., Blakey, D. C., Galbraith, S. M., Tozer, G. M., Holder, A. L., Naylor, M. A., Nolan, J., Stratford, M. R., Chaplin, D. J., and Hill, S. A. ZD6126: A novel vascular-targeting agent that causes selective destruction of tumor vasculature. Cancer Res., 62: 7247–7253, 2002. **50**

Dellian M, Witwer BP, Salehi HA, Yuan F et al. Quantitation and physiologiactal characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment. Am. J. Pathol. 149, 59 – 71. 1996. **80**

Deutsche Krebshilfe e.V. Krebs der Bauchspeicheldrüse. 3/2003. **83**

Dietmar W., Siemann, Ph.D., Wenyin Shi, M.D., Ph.D. Efficacy of combined antiangiogenic and vascular disrupting agents in treatment of solid tumors. Int. J Rad. Onc. Biol. Phys. 60: 4, 1233 – 1240, 2004. **63**

Duffy JP, Eibl, Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer, Mol. Cancer, 2003. **16**

Einführung in die pharmazeutischen Wissenschaften. Institut für pharmazeutische Wissenschaften, Onlineskript, ETH Zürich, 2004. **73**

el-Rayes BF, Shields AF, Vaitkevicius V; Developments in the systemic therapy of pancreatic cancer; Cancer Invest. 2003; 21(1):73-86. **6**

Evelhoch, Z. He, L. Polin, T.H. Corbett, D.R. Checkley, et al. MRI Evaluation of the effect of ZD6126 on Tumor Vasculature. AACR, New Orleans, LA, March 24 – 28, 2001. **71**

Fleming JB, Brekken RA; Functional imaging of angiogenesis in an orthotopic model of pancreatic cancer; J Cell Biochem. 2003 Oct 15; 90(3): 492-501. **4**

Folkman J, Hanahan D., Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis, Princess Takamatsu Symp. 1991, 22:339-47. **13**

Folkman J, The role of angiogenesis in tumor growth. Semin Cancer Biol. 1992 Apr;3(2):65-71. **14**

Folkman J; Tumor angiogenesis: Therapeutic implications; N.Engl.J.Med. 1971 Nov 18; 285(21):1182-6. **8**

Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D; Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia; Nature 1989 May 4; 339 (6219):58-61. **15**

Fons P, Malavaud B, Venat L, Plouet J. [Anti-angiogenesis strategies in cancer]; Bull Acad Natl Med. 2000;184(3):579-86; discussion 586-7. **20**

Foth, Henschler, Rummel. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage, Urban & Fischer Verlag. **74**

Gastrointestinal Tumor Study Group: Radiation therapy combined with adriamycin or 5-fluorouracil for the treatment of locally unresectable pancreatic carcinoma. Cancer 56 (1985) 2563-2568. **58**

Gavrieli, Y. et al. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell. Biol. 119, 493-501, 1992. **57**

Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wacker H.H., Schwab U., and Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J. Immunol. 133, 1710 -1715, 1984. **41**

Gerdes J., Schwab U., Lemke H., and Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int. J. Cancer 31, 13 – 20, 1983. **40**

Gianluca Micheletti, Maura Poli, Patrizia Borsotti, Michele Martinelli, Barbara Imberti, Giulia Taraboletti, Raffaella Giavazzi. Vascular-targeting Activity of ZD6126, a Novel Tubulin-binding Agent. Cancer Res. 63, 1534 - 1537, 2003. **62**

Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Leapman SB, Folkman J. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. J Natl Cancer Inst. 1974 Feb;52(2):413-27. **19**

Goto, H., Yano, S., Zhang, H., Matsumori, Y., Ogawa, H., Blakey, D.C., Sone, S. Activity of a new vascular targeting agent ZD6126, in pulmonary metastases by human lung adenocarcinoma in nude mice. Cancer Res., 62: 3711 – 3715, 2002. **66**

Grosios, K., Holwell, S. E., McGown, A. T., Pettit, G. R., and Bibby M. C. In vivo and in vitro evaluation of combretastatin A-4 and its sodium phosphate prodrug. Br. J. Cancer 81: 1318–1327, 1999. **56**

Guba, M., Cernaianu, G., Koehl, G., Geissler, E. K., Jauch, K. W., Anthuber, M., Falk, W., and Steinbauer, M. A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis. Cancer Res., 61: 5575–5579, 2001. **48**

Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C. J., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, *et al.* Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. Nat. Med., 8: 128–135, 2002. **49**

Hanahan D., Folkman J, Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis, Cell 1996. **12**

Harris A.L.; Are angiostatin and endostatin cures for cancer? Lancet 1998 May 30; 351 (9116): 1598-9. **11**

Hill, S. A., Sampson, L. E., and Chaplin, D. J. Anti-vascular approaches to solid tumour therapy: evaluation of vinblastine and flavone acetic acid. Int. J. Cancer, 63: 119–123, 1995. **36**

Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. Nat Med. 1995 Feb;1(2):149-53. **28**

Horner SA, Gould S, Noakes JP, Rattray NJ, Allen SL, Zotova E, Arezzo JC. Lack of neurotoxicity of the vascular targeting agent ZD6126 following repeated i.v. dosing in the rat. Mol Cancer Ther. 2004 Jul;3(7):783-91. **67**

Horsman MR, Murata R. MGRE MRI, Robinson et al. Vascular targeting effects of ZD6126 in a C3H mouse mammary carcinoma and the enhancement of radiation response. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 57(4):1047-55, 2003. **34**

Junquiera, Carneiro; Histologie; Springer Verlag, 6. Auflage. **60**

Klagsbrun M, Moses MA. Molecular angiogenesis. Chem Biol. 1999 Aug;6(8):R217-24. **25**

Liu WM, Bamford C, Slevin M, Joel SP; Effects of haemopoietic growth factors in combination with etoposide on sister chromatid exchange frequencies in peripheral blood mononuclear cells. Cancer Chemother Pharmacol 1998; 41(4):343-6. **18**

McCarty MF, Takeda A, Stoeltzing O, Liu W, Fan F, Reinmuth N, Akagi M, Bucana C, Mansfield PF, Ryan A, Ellis LM., ZD6126 inhibits orthotopic growth and peritoneal carcinomatosis in a mouse model of human gastric cancer. Br J Cancer. 2004 Feb 9;90(3):705-11. **30**

Mignatti P, Rifkin DB., Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. Enzym Protein. 1996; 49(1-3): 117-37. **17**

Mohle R, Rafii S, Moore MA. The role of endothelium in the regulation of hematopoietic stem cell migration. Stem Cells. 1998;16 Suppl 1:159-65. **26**

Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 15, 244 – 249. 1995. **81**

Okusaka T, Kosuge T.; Systemic chemotherapy for pancreatic cancer. Pancreas. 2004 Apr;28(3):301-4. **7**

Oltavai, Z. and Korsmeyer, S.J. Checkpoints of duelling dimmers foil death wishes. Cell 79, 189-92, 1994. **39**

Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY.; JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. J Clin Pathol. 43(9):752-7, 1990. **46**

Pepper MS. ;Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. Cytokine Growth Factor Rev. 1997 Mar;8(1):21-43.

22

Philip E., Thorpe, Vascular Targeting Agents as Cancer Therapeutics. Clin. Cancer Res. 10, 415 – 427, 2004. **61**

Prox D, Becker C; Treatment of human pancreatic cancer in mice with angiogenic inhibitors; World J Surg. 2003 Apr; 27(4): 405-11. **9**

Raben, Bianco, Damiano, Bianco, Melisi, Mignogna et al. Antitumor activity of ZD6126, a novel vascular-targeting agent, is enhanced when combined with ZD1839, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, and potentiates the effect of radiation in a human non-small cell lung cancer xenograft model. Mol. Cancer Ther. 3(8), 977 – 983, 2004. **65**

Robert-Koch-Institut, Krebsstatistik. **1**

Rowinsky, E. K., Cazenave, L. A., and Donehower, R. C. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. J. Natl. Cancer Inst., 82: 1247–1259, 1990. **35**

Rüegg. Ein neuer Ansatz in der Krebstherapie: die tumorbedingten Gefäßneubildungen. Schweiz Med Forum 14, 317 – 323, 2002. **69**

Sauer. Neuere Substanzen zur medikamentösen Therapie des Mammakarzinoms. Online-Skript, Tumorzentrum München, 14.Sep.1998.

82

Schmoll HJ, Buchele T, Grothey A, Dempke W. Where do we stand with 5-fluorouracil? Semin Oncol 26(6):589 – 605. Dec 1999. **77**

Schrape S., Jones D.B., and Wright D.H. A comparison of three methods for the determination of the growth fraction in Non-Hodgkin`s Lymphoma. British J. Cancer 55, 283 – 286, 1987. **42**

Shepherd FA, Sridhar SS., Angiogenesis inhibitors under study for the treatment of lung cancer., Lung Cancer. 41 Suppl 1:S63-72, 2003. **32**

Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, Yeo KT, Yeo TK, Allende R, Folkman J, D'Amore PA; Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. Mol Med. 1995 Jan;1(2):182-93. **23**

Siemann DW, Horsman MR., Enhancement of radiation therapy by vascular targeting agents., Curr Opin Investig Drugs. 11:1660-5, 2002. **33**

Siemann, D. W., and Rojiani, A. M. Antitumor efficacy of conventional anticancer drugs is enhanced by the vascular targeting agent ZD6126. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 54: 1512–1517, 2002. **55**

Siemann, D. W., and Rojiani, A. M. Enhancement of radiation therapy by the novel vascular targeting agent ZD6126. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 53: 164–171, 2002. **54**

Solorzano, C. C., Baker, C. H., Bruns, C. J., Killion, J. J., Ellis, L. M., Wood, J., and Fidler, I. J. Inhibition of growth and metastasis of human pancreatic cancer growing in nude mice by PTK 787/ZK222584, an inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases. *Cancer Biother., Radiopharm.* 16: 359–370, 2001. **53**

Soltau Jens, Dreves Joachim; *IDrugs* 2004 Apr;7(4):380-7. **59**

Steller, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-49, 1995. **2**

Tavani A., Pregnatolo A., Negri E., La Vecchia C.: Alcohol consumption and the risk of pancreatic cancer. *Nutr. Cancer* 1997, 27: 157-161. **3**

Tazzari P.L., Bontadini A., Gobbi M., Tassi C., Dinota A., Visani G., Michieli M.G., Pileri S., Baccarani M., and Tura S. Comparison of the DNA content, bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 antigen expression in human acute myeloid leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 3, 45 – 51, 1990. **44**

Varghese, MacKenzie, Groom, Christopher G. Ellis, A. Ryan, I. C. MacDonald, A. F. Chambers. In vivo videomicroscopy reveals differential effects of the vascular-targeting agent ZD6126 and the anti-angiogenic agent ZD6474 on vascular function in a liver metastasis model. Angiogenesis. 7: 157 – 164, 2004. **64**

Wanebo H. J., Vezeridis M. P. Pancreatic carcinoma in perspective. A continuing challenge. Cancer (Phila.), 78: 580-591, 1996. **5**

Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C.; Pancreatic Carcinoma. N Engl J Med. 13;326(7):455-65, 1992. **37**

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature. 2000 Sep 14;407(6801):242-8. **70**

Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

Abstracts

C.J. Bruns, A. Kleespies, G. Köhl, **M. Friedrich**, A. Ryan, A. Barge and K.-W. Jauch. Antitumor and Antimetastatic Activity of the Novel Vascular-targeting Agent ZD6126 in a Primary Pancreatic Model of Tumor Growth

C.J. Bruns, G. Köhl, A. Kleespies, **M. Friedrich**, A. Ryan, A. Barge and K.-W. Jauch. Anti-vaskuläre Aktivität von ZD6126 als Therapiestrategie gegen das Primärtumorwachstum und Lymphknotenmetastasierung beim humanen Pankreaskarzinom im orthotopen Nacktmausmodell.

C.J. Bruns, G. Köhl, A. Kleespies, **M. Friedrich**, A. Ryan, A. Barge and K.-W. Jauch. Vascular-targeting activity of ZD6126 against primary pancreatic tumour growth and lymph node metastasis following orthotopic tumour cell injection in a nude mouse model. EORTC-NCI-AACR 2002

Poster

C.J. Bruns, G. Köhl, A. Kleespies, **M. Friedrich**, A. Ryan, A. Barge and K.-W. Jauch. Vascular-targeting activity of ZD6126 against primary pancreatic tumor growth and lymph node metastasis following orthotopic tumor cell injection in a nude mouse model. International Symposium on Anti-Angiogenic Agents, January 2003.

Originalarbeiten

A. Kleespies, G. Köhl, **M. Friedrich**, A. J. Ryan, A. Barge, K.-W. Jauch, C. J. Bruns

Vascular targeting in pancreatic cancer: The novel tubulin binding agent ZD6126 reveals antitumor activity in primary and metastatic tumor models

Accepted in Neoplasia 06/2005

Danksagung

Mit dem Abschluss dieser Dissertation gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. K. – W. Jauch, der es mir ermöglichte, diese Arbeit an seiner Klinik zu erstellen.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. C. J. Bruns, für die Überlassung des sehr interessanten und abwechslungsreichen Themas, und unabhängig zu welcher Zeit, mir mit Rat und Tat hilfreich zur Seite stand.

Ebenfalls danke ich Frau Gudrun Köhl für die gewährte Unterstützung.

Mein Dank gilt ebenfalls allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Chirurgie, die direkt oder indirekt die Studie unterstützten und mitgetragen haben.

Zu guter Letzt, aber nicht minder herzlich, gebührt meinen Eltern großer Dank, die mich über die ganzen Jahre des Studiums begleitet und unterstützt haben und ohne welche die Approbation und Dissertation so nie möglich gewesen wären. Auch gilt mein Dank meiner Freundin Evelyn, welche mir stets mit Ihrem Wissen und Ihrer Geduld zur Seite stand.

Curriculum vitae – Michael Friedrich

Geburtsdatum: 08.03.1976

Eltern: Marianne Friedrich, geb. Helget

Geburtsort: Regensburg

Hans-Jürgen Friedrich

Konfession: römisch - katholisch

Ausbildung

1/2005 – aktuell	Kreiskrankenhaus Wörth Assistenzarzt der Chirurgie
4/2004 – aktuell	Universität Regensburg Studium der Zahnmedizin
09/97 – 4/2004	Universität Regensburg Studium der Humanmedizin - Approbation
07/96 – 07/97	Zivildienst am Klinikum der Universität Regensburg Springer im chirurgischen OP
06/96	Privates Gymnasium Pindl, Regensburg Allgemeine Hochschulreife

Berufserfahrung

04/03 – 03/04	Praktisches Jahr Innere Medizin, Kantonsspital St. Gallen, CH Innere Medizin, Klinikum der Universität Regensburg Chirurgie, Spitalzentrum Biel, CH Urologie, St. Josef Krankenhaus Regensburg
09/02 – 10/02	Famulatur, St. Josef Krankenhaus Regensburg Abteilung für Plastische-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
08/02 – 09/02	Famulatur Urologische Praxis, München
03/00 – 04/00	Famulatur, Rudolfstiftung Wien Chirurgie, Gynäkologie
09/00 – 10/00	Famulatur, Barmherzige Brüder Regensburg Unfallchirurgie